



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

La GTPasa RRas2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal

TESIS DOCTORAL

PILAR MENDOZA DAROCA

MADRID, 2015



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

La GTPasa RRas2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal

PILAR MENDOZA DAROCA

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA

DIRECTOR: DR. BALBINO ALARCÓN

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR “SEVERO OCHOA” (CBMSO)

Tesis Doctoral

La GTPasa RRas2 regula la demanda energética de los linfocitos B durante la reacción de centro germinal

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada Pilar Mendoza Daroca para optar al grado de Doctor en Biología Molecular.

Director de la tesis:

Dr. Balbino Alarcón Sánchez

Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), bajo la dirección del Dr. Balbino Alarcón Sánchez y financiado con una beca de postgrado para la Formación del Personal Investigador (BES-2011-043448).

A mis padres y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Balbino, no sólo por ser el director de esta tesis, sino por ser un verdadero mentor. Porque siempre he creído que la mejor manera de instruir es a través del ejemplo, y tu ejemplo, persistencia y dedicación a la ciencia es algo que ha dejado una impronta no solamente en mí, sino en mi opinión en todos los que hemos formado parte de este laboratorio. No por casualidad se nos conoce a todos nosotros como los “Balbinos”. Y ésa otra cosa por la que estoy infinitamente agradecida, porque este laboratorio 221 donde pasamos de lejos muchas más horas que en cualquier otro sitio, es verdaderamente una familia, y eso es en gran parte tu mérito. Gracias por haber creado un entorno en el que sentirse en casa.

Gracias a Paco Sánchez Madrid por darme el consejo más importante hace ya más de 5 años y por el que estoy en este laboratorio. Thanks to Tomohiro Kurosaki and Wataru Ise for giving me the incredible opportunity of spending a time in one the best Immunology laboratories of the world. I learned so much from you being there and I hope to be able to collaborate with you in the future.

Gracias a todos los miembros del laboratorio, a los que están y a lo que han continuado su aventura fuera. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, por todo lo que me habéis ayudado, por vuestra paciencia, por vuestra calidad científica pero también por vuestras risas, y vuestro cariño en los momentos difíciles. Y porque venir a trabajar no parece venir a trabajar gracias a vosotros. A Aldo, que es la columna vertebral del grupo y lo mejor que me ha pasado profesionalmente. Antes no sabía que se podía ser así de alegre y además de manera casi constante día tras día. Eres el que nos recuerdas constantemente que la vida es maravillosa “a pesar de todo”. Todos los días. Los que te rodeamos no sabemos la suerte que tenemos. Gracias por la generosidad de compartir tu sapiencia científica con todos. Por ayudarnos a diseñar los experimentos con una enorme paciencia y una enorme sonrisa. Sé que nunca me va a volver a tocar la suerte de tener un compañero así. A Hisse, porque compartir laboratorio contigo es un auténtico lujo. Eres la referencia a la que siempre acudimos porque sabemos que si lo dices tú, es así. Gracias por atendernos con una humildad y una paciencia para mí asombrosa. Gracias por tus consejos siempre clave en los momentos más complicados. A Irene. Gracias porque contigo todo es siempre más suave, más amable, más fácil. Gracias por esa enorme confianza que siempre me transmites. Y porque no sólo es con las películas y los libros: la vida a través de tus ojos, relatada por ti, es casi más deslumbrante que viviéndola directamente. A Raquel, que me enseñó todo cuando llegué aquí más perdida que nada, y de la que aprendí mucho más que sólo de ciencia. Te echamos muchísimo de menos. A Elena Fernández-Arenas por empujarme a tener más aspiración, por escuchar atentamente mis experimentos y aportarme tantas cosas con las que mejorar. A Ana, por contagiarme tu ilusión, por ser una compañera de tesis con la que poder compartir todos los agobios y estreses propios de la tesis, pero también todas las alegrías y emociones. A Enrique, por ser un inmejorable compañero de mesa, y aguantar todas mis idas y venidas, sobre todo en estos últimos meses. A Cristina, porque este trabajo sin tu apoyo sería completamente imposible. Por siempre querer implicarte más y adelantarte a darnos tu ayuda. Porque eres una maga y siempre sabes lo que nos pasa a todos. Gracias a Viola por escoger una casa en Hermosilla. Y todo lo demás es tanto que no me cabe aquí. Por convertirte en una persona fundamental en mi vida. Por tu valentía, tu sensibilidad, por reivindicar tus ideas del mundo, tan alejadas del mundo que vivimos. Por

enseñarme a ser mejor: mejor científica, mejor amiga, y mejor persona. Gracias a Elena por ser tan creativa, por tener esa paciencia infinita con el trabajo que yo contemplo y envidio constantemente. Por su manera de hacer y enfrentar las cosas. Por regalarnos tantas cosas y ser la persona más detallista que conozco. Gracias a Diana por siempre tener una sonrisa, por estar siempre tan dispuesta a ayudar, a trabajar, a pensar con nosotros. Gracias por tu infinita generosidad. Gracias a Clara, porque nos has metido en tu bolsillo desde el minuto uno. Por traer alegría a nuestra U. De verdad, no sé qué hubiera hecho estos últimos meses sin ti. A Valentina, por ser una segunda madre cuando lo he necesitado. A Tania por tu inmensa ayuda con los ratones. A Nadia por ser tan buena compañera. A los compañeros de los laboratorios vecinos, especialmente a los Toris (Juan, Marta, Patri, Marina, Alba, Sara y Chus), que son un apoyo imprescindible. Deberíamos anexionarnos ya de una vez. A los López de Castro (Alex, Pablo, Adrián, Carlos), y a Elena Campos, que me saca siempre de los apuros más comprometidos cuando ya tengo 15 bazos en tubos y me falta un anticuerpo.

Gracias a mi grupo de amigos: Lucía, Alfonso, Miguel, Marta, Cris, Dani, Edu, Inés, y Alejo, con los que sigo soñando abrir un centro de investigación que dirijamos entre todos, porque gracias a vosotros esto que hacemos me sigue pareciendo lo mejor que se puede hacer en la vida. Y compartir profesión y pasión con vosotros es lo mejor que me ha pasado desde que decidí estudiar esta carrera. Lucía, gracias por ser la científica más perfecta que conozco, por ser la alternativa del grupo y sacarnos de lo obvio. Por ser un apoyo tan incondicional. Alfonso, gracias por estar ahí tanto y tan desde al principio. Sin tus bromas y tu humor me hubiera hundido yo creo que en 2º de carrera. Miguel, eres de lejos la persona con más talento que me he cruzado. Ser tu amiga, además de ser un verdadero privilegio, es una fuente de inspiración y de inquietud. Gracias a Marta por enseñarme tantísimas cosas, entre otras a aceptarme como soy. Por hacerme sentir parte de tu maravillosa familia, por escucharme, por ayudarme con la tesis. Por compartir conmigo lo que piensas del mundo, y hacerme ver que hay tantas cosas que merecen la pena. Sois todos un core del que odiaría alejarme. Os adoro. Gracias a Cris por ser tan buena amiga, y por estar siempre a la altura de las circunstancias incluso cuando los demás no lo hemos estado. Por estar ahí y preocuparte. A Dani, a Julio, a Edu y Flo, y a Inés porque estar con vosotros siempre me reconcilia un poco la vida. A Alejo. Esta tesis, igual que casi todo el resto de cosas que hago, está llena de marcas de tu paso por mi vida. Tu influencia no sólo es extensísima sino que es algo de lo que me siento profundamente orgullosa y sólo tengo agradecimiento hacia ti y hacia el destino que nos juntó en la misma clase hace ya tantos años.

Gracias a mis amigas Sonsoles, Natalia y Muriel. Sonso, gracias por darme la oportunidad de viajar, por ser tan cariñosa, por defenderme y defendernos a todas no matter what. Cuando creo que no me puedes sorprender más, siempre me sorprendes y siempre para bien. Nata, gracias por luchar por nuestra amistad, por no abandonar, por tu amor. Gracias por tu enorme talento y creatividad, por aportarnos tantas cosas. Por ser una artista. Muriel, si no estuvieras en mi vida tendría que haberte ido a buscar a los confines del universo (sí, el universo). Eres la persona que está más cerca de mí estando la que más lejos. A veces me sigo preguntando de dónde sacas tanta sabiduría, tanta empatía y tanta magia. Pero luego me acuerdo de que no todo tiene explicación (algo que me supone un verdadero problema reconocer como científica) y me conformo con que seas mi amiga por los siglos de los siglos (y lo siento, no me conformo con menos). Haces que esté agradecida no sólo a ti sino a la cantidad de oportunidades maravillosas que se me han brindado.

Gracias a Iker, a Pati, a María y a Isa. Iker, gracias por no haberme dejado que deje de bailar. Porque eres mi conexión con el mundo real, porque siempre me muestras que la vida es mucho más sencilla de lo que a veces nos plantamos, y que hay que moverse, actuar, luchar por los sueños. Eres de mis mejores influencias. A Pati, porque siempre tienes las palabras adecuadas en el momento adecuado. Porque eres un ejemplo de superación al que ya me gustaría a mí parecerme mínimamente. Por tu sonrisa y por tu risa. A María, M.A, por todas las incontables aventuras que hemos vivido juntas. Por empujarme a hacer tantas cosas, por descubrirme tanto, por hacer conmigo el blog. Te echo tanto de menos que sólo pienso en que vuelvas. A Isa, por ser la mejor amiga y compañera de piso, por cuidarme tanto. Por ser tan generosa. Gracias también a Pablo, por tus muchas horas ayudándome. Gracias por tu ánimo.

Gracias a toda mi familia, especialmente a mi tío Pepe Luis y mi tía Pili. Tío, gracias por la confianza que has depositado en mí y que me ha movido siempre a ser mejor. Gracias por tu ejemplo y por tu cariño. Gracias por las memorias más bonitas que he leído y que van a ser un legado para la familia. A mi tía Pili, por iniciarme en la investigación y por ser el apoyo fundamental de la familia. A Lola y a Ana, por ser tan cariñosas siempre conmigo. A Rafa por siempre mantener el humor y por ser el padre de las dos joyas de la familia. A Mateo y Genoveva, porque son la razón de que todo este trabajo, y todo lo que contribuya a hacer un mundo mejor, merezca la pena.

A mis padres y mi hermana, porque aunque ellos probablemente no lo saben, nunca hubiera tomado la decisión de hacer la tesis, ni probablemente ninguna decisión importante en general, sin ellos. Y no porque sea una indecisa insoportable (que también) sino porque habéis depositado una confianza en mí de una magnitud que todavía no entiendo, pero que me ha empujado a intentar todos los desafíos que se me han puesto por delante. Sólo espero estar a la altura y acordarme de vuestra confianza cuando no estéis cerca. Papá, gracias por transmitirme la rigurosidad, el espíritu crítico, el no aceptar nada que no pueda ser razonado. De ti he sacado toda la visión científica así que esta tesis es tan mía como tuya. Gracias por enseñarme a ser humilde, y a buscar los éxitos trabajando. Mamá, gracias por enseñarme a que nunca hay que renunciar a buscar la felicidad. En ningún momento, en ninguna circunstancia. De ti he aprendido a ser inconformista, quizá a veces demasiado, pero a cambio, todo lo que he vivido (incluida esta tesis) lo he vivido tan intensamente que no lo cambiaría por nada. Gracias por renunciar a tantas cosas por nosotros. Gracias por tu fuerza y por no dejar de luchar cuando has estado cansada. Sin ti nada hubiera funcionado. Gracias a mi hermana. De todas las cosas fortuitas que me ha tocado vivir, el ser tu hermana ha sido de lejos la mayor de mis suertes. Eres simplemente perfecta, eres mi inspiración y mi ejemplo a seguir. Eres la demostración de que se puede ser buena en todo: inteligente, trabajadora incansable, emprendedora, exitosa, buena amiga, buena madre, buena hermana, buena hija, y sobre todo buena persona. Espero con los años conseguir parecerme un poquito a ti. A vosotros va dedicada esta tesis.

Durante estos años he tenido la suerte de dedicarme a un mundo dominado por las mujeres en número pero no en puestos de responsabilidad. Que esto cambie no sólo me parece que ha de ser un serio compromiso social, sino que no puede ser de otra forma. Gracias a todas las mujeres investigadoras con las que he compartido estos años, muy especialmente a las jefas de grupo, todas de una calidad indiscutible, y que demuestran que no sólo se puede llegar sino que hay que llegar. Gracias, porque nos inspiran y animan a todas las que estamos empezando. Gracias por mantener vivas nuestras aspiraciones.

ÍNDICE

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	11
ÍNDICE	17
ABREVIATURAS	25
SUMMARY	29
RESUMEN	33
INTRODUCCIÓN	37
1. La respuesta inmune humoral.....	39
2. La reacción de los centros germinales	41
2.1. Poblaciones celulares dentro del centro germinal	41
2.2. Dinámica de la respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T	45
2.3. El proceso de selección clonal	48
3. Centros germinales y linfomagénesis	51
4. Vías de señalización de los linfocitos B	53
4.1. Señalización mediada por el BCR.....	53
4.2. Señalización mediada por CD40	59
5. La superfamilia Ras	60
5.1. La familia Ras	61
5.2. La GTPasa RRas2	63

6.	RRas2 y tumorigénesis	64
6.1.	Rutas de señalización implicadas en la tumorigénesis inducida por RRas2 ..	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....		67
7.	Materiales.....	69
7.1.	Líneas celulares.....	69
7.2.	Ratones	69
7.3.	Reactivos y soluciones.....	72
7.4.	Anticuerpos.....	74
7.5.	Vectores	76
7.6.	Oligos usados para RT-qPCR	76
8.	Métodos	77
8.1.	Obtención y purificación de células T y B primarias de ratón.....	77
8.2.	Extracción de ADN genómico para el genotipado de los ratones	78
8.3.	Transducción de líneas celulares	78
8.4.	Citometría de flujo.....	80
8.5.	Análisis de ciclo celular.....	80
8.6.	Análisis de proliferación celular	81
8.7.	Inmunizaciones y generación de centros germinales	81
8.8.	Análisis de expresión génica por RT-qPCR	82
8.9.	Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	83

8.10.	Análisis de expresión génica por microarray.....	83
8.11.	Sondas mitocondriales (Mitotracker®).....	83
8.12.	Medida del consumo celular de oxígeno	84
8.13.	Curvas de supervivencia.....	84
8.14.	Estudios anatomopatológicos.....	84
8.15.	ELISA de NFκB.....	85
8.16.	Western Blot y activación de células B.....	85
8.17.	Estudios estadísticos.....	85
OBJETIVOS.....		87
RESULTADOS.....		91
1.	RRas2 desempeña un papel esencial, no redundante, e intrínseco de las células B en la formación de centros germinales.	93
1.1.	El papel de RRas2 en las células B es específico y no redundante	93
1.2.	La deficiencia en RRas2 produce un defecto en la formación de centros germinales	97
1.3.	La deficiencia en RRas2 causa un defecto en la generación de células B de CG específicas de antígeno y en las células memoria.....	100
1.4.	El papel de RRas2 en la formación de CG es intrínseco de las células B	101
1.5.	RRas2 es necesario para la generación de anticuerpos de alta afinidad	104
2.	Las células B de CG deficientes en RRas2 se acumulan como centroblastos	106
2.1.	Las células B de CG deficientes en RRas2 se acumulan presentan un defecto en la modulación negativa de IgD e IgM	106

2.2.	Las células B de CG deficientes en RRas2 se acumulan en el estadio de centroblastos.....	107
2.3.	Las células B de CG de ratones <i>RRAS2</i> ^{-/-} se acumulan en el estadio G0/G1 del ciclo celular.....	109
3.	Defecto en la proliferación B en respuesta a los estímulos del BCR y CD40 en ausencia de RRas2	113
3.1.	Las células B deficientes en RRas2 tienen un defecto proliferativo en respuesta a estímulos del BCR y de CD40	113
3.2.	Las células B deficientes en RRas2 tienen un defecto en la activación de la vía de señalización P13K/Akt	114
4.	RRas2 es necesario para la activación de la vía no canónica de NFκB en células B	118
4.1.	RRas2 es necesario para la activación de la vía no canónica de NFκB	119
4.2.	RRas2 activa a NFκB a través de un mecanismo dependiente de PI3K.....	122
5.	RRas2 controla la función mitocondrial de los centros germinales	124
5.1.	Las células B carentes de RRas2 contienen más mitocondrias	126
5.2.	Las células B de centro germinal deficientes en RRas2 tienen más mitocondrias pero son menos funcionales	127
5.3.	Las células B carentes de RRas2 no son capaces de cumplir las demandas energéticas celulares tras la estimulación del BCR	128
5.4.	Las células B deficientes en RRas2 tienen niveles disminuidos de ATP5D ..	132
6.	RRas2 se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de linfomas humanos	133
7.	RRas2 desempeña un papel pro-tumoral en la formación de linfomas de ratón	134

7.1.	La deficiencia en RRas2 retrasa la mortalidad de los ratones deficientes en el supresor tumoral p53	135
7.2.	La ausencia de RRas2 altera el espectro tumoral de los ratones <i>Trp53^{-/-}</i> ...	136
7.3.	La ausencia de RRas2 acelera la mortalidad de los ratones <i>Eμ-myc</i>	140
7.4.	La ausencia de RRas2 modifica el espectro tumoral de los ratones <i>Eμ-myc</i>	141
8.	RRas2 juega un papel en la maduración de las células B	142
8.1.	Las células de médula ósea de ratones <i>RRAS2^{-/-}</i> muestran un defecto en la transición entre los estadios de Pro-B a Pre-B de la maduración del linaje B	143
8.2.	Las células de médula ósea deficientes en RRas2 tienen una desventaja de colonización en todos los estadios de progenitores B excepto en el estadio Pro-B en experimentos de reconstitución competitiva	145
9.	RRas2 determina la capacidad proliferativa y tumoral de una línea celular derivada de linfomas humanos	149
9.1.	La disminución de los niveles de expresión de <i>RRas2</i> disminuye la capacidad proliferativa de la línea celular Raji <i>in vitro</i>	149
9.2.	La disminución de los niveles de RRas2 altera la capacidad tumorigénica de las células Raji <i>in vivo</i>	151
DISCUSIÓN		155
1.	El papel no redundante de RRas2 en la formación de centros germinales	157
1.1.	Los miembros de las Ras clásicas no compensan la pérdida de la actividad RRas2	157
1.2.	Mecanismos moleculares mediados por RRas2 en el centro germinal	158
1.3.	Regulación de RRas2 de la proliferación celular mediada por el BCR y CD40	158
1.4.	RRas2 en la dinámica de los linfocitos B dentro del CG	160

2. Regulación metabólica de RRas2 en los linfocitos B	161
2.1. Implicación de la ruta de PI3K en el metabolismo de los linfocitos B	162
3. El papel de RRas2 en la formación de neoplasias linfoides	165
3.1. Papel de RRas2 en el desarrollo tumoral en modelos de ratón y en líneas tumorales humanas	168
3.2. RRas2: eje central entre el metabolismo y el cáncer	170
4. RRas2 en el desarrollo de los linfocitos B	171
CONCLUSIONES.....	175
BIBLIOGRAFÍA.....	179

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACK	Tampón de lisis de eritrocitos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BCR	Receptor para el antígeno en células B
BSA	Albumina de suero bovino
CD	Antígeno de diferenciación
cDNA	ADN copia
CXCR4	Receptor de quimioquinas C-X-C tipo 4
CXCR5	Receptor de quimioquinas C-X-C tipo 5
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DZ	Zona oscura
ECL	Sistema de revelado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero Fetal Bovino
FC	Citometría de flujo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FO	Zona Folicular de los órganos linfáticos secundarios
GDP	Guanosín-Difosfato
GEF	Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina
GTP	Guanosín-Trifosfato
GTPasa	Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IB	Inmunoblot
ICOS	Co-estimulador inducible de células T
IFN γ	Interferón Gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL2	Interleuquina-2
IL21	Interleuquina-21
IOAA	Yodoacetamida
i.p	intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
i.v	intravenoso
ITAM	Motivo de activación basado en tirosinas del inmunorreceptor
KDa	Kilodalton

LT	Lisado total
LZ	Zona clara
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Quinasa de MAPK/ERK
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
Min	Minutos
MZ	Zona marginal de los órganos linfáticos secundarios
NF-kB	Factor Nuclear kB
NK	Asesina natural
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato
PI3K	Enzima fosfatidilinositol 3 quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de Roswell Park Memorial Institute
RRas	Proteína relacionada con Ras
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
s	segundos
SDS-page	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SV40	Virus de Simio 40
TBS-Tween	Salino tamponado con Tris-Tween
TCR	Receptor de células T
T _{FH}	Célula T folicular cooperadora
Th	Célula T cooperadora
WB	Western Blot
WT	Forma silvestre de una proteína

SUMMARY

SUMMARY

In this work we show that the Ras-related GTPase RRas2 plays an essential, non-redundant and B cell-intrinsic role in the germinal center (GC) reaction. Mice deficient in RRas2 have less GC B cells and produce less switched antibodies and memory B cells, a phenomenon not observed in the absence of the highly-related RRas or the classic HRas and NRas subfamily members. In addition to the interaction with the BCR, we prove that RRas2 is also recruited to the GC-essential receptor CD40. This triggers the activation of the alternative but not the canonical NF κ B pathway by both BCR and CD40 receptors through a PI-3 kinase-dependent process. Germinal centers are divided in two zones: the dark zone, where germinal center B cells undergo extensive proliferation and experience somatic hypermutation in their immunoglobulin genes, and the light zone, where the newly-formed BCR is tested for their affinity towards the antigen that has elicited the immune response and where BCR and CD40 trigger survival and selection signals. Mice deficient in RRas2 have an accumulation of germinal center B cells with a dark zone phenotype. This observation places RRas2 as a critical molecule for the correct dynamic evolution of the germinal center.

Furthermore, we provide evidence that RRas2 controls B cell energy supply, since its absence produces an inefficient rise in mitochondrial metabolism upon activation. Since B cells are dependent on activation signals for their conversion into germinal center cells, we propose that the impairment observed in RRas2-deficient germinal center B cells is due to a stifled metabolism that makes them unable to meet the high energy demands to which these cells are subjected. In addition, our work shows that the PI3K pathway is related to mitochondrial activity through the activation of the mTORC1 kinase complex. Therefore, we propose that RRas2 might be directing the energetic response through the PI3K route.

Finally, we explore the role of RRas2 in lymphomagenesis, given that most B-cell lymphomas are germinal center-derived. Taking advantage of two different tumor-prone animal models (*Trp53*^{-/-} and *E μ -myc*) we show that RRas2 plays a role in the development of lymphoid malignancies and that its absence prevents the formation of lymphomas in favor of other types of neoplasias. Additionally, we have discovered that RRas2 participates in B-cell development and RRas2-deficient mice show an accumulation of early B cell progenitors at the Pro-B stage. This role might be causing more immature B cell lymphomas in the *E μ -myc* model. These results suggest that RRas2 could be acting as a downstream effector of other surface molecules and open a new field in which other functions for this GTPase should be addressed in the future.

RESUMEN

RESUMEN

En este trabajo demostramos que la GTPasa perteneciente a la familia R-Ras RRas2 desempeña un papel esencial, no redundante e intrínseco a los linfocitos B en la reacción de los centros germinales (CG). Los ratones deficientes en RRas2 tienen menos linfocitos B de centro germinal, producen menos anticuerpos que han experimentado el cambio de isotipo, y menos células B de memoria, un fenómeno que no se observa en ausencia de RRas1, el miembro más cercano a RRas2 de la familia R-Ras, ni en ausencia de los miembros H-Ras o N-Ras de la subfamilia Ras clásicas. Hemos probado que RRas2, además de interactuar con el BCR, se une al co-receptor CD40, una molécula señalizadora esencial para el desarrollo de los CG. La interacción con ambos receptores participa en la activación de la vía no canónica de NFκB en un proceso dependiente de PI3K. Los centros germinales se dividen en dos regiones anatómicas: la zona oscura, donde los linfocitos B experimentan sucesivas rondas de proliferación y de hipermutación somática, y la zona clara, donde los BCR recién formados ponen a prueba su afinidad por el antígeno que ha desencadenado la respuesta inmune, y donde los linfocitos B reciben las señales de supervivencia y selección. Los ratones carentes de RRas2 presentan una acumulación de linfocitos B con un fenotipo de zona oscura. Esta observación sitúa a RRas2 como una molécula clave para el correcto desarrollo dinámico del centro germinal.

También proporcionamos evidencias de que RRas2 controla el suministro de energía de los linfocitos B, dado que su ausencia produce un déficit en el aumento de metabolismo mitocondrial en condiciones de activación. Dado que las señales de activación son fundamentales para la conversión de los linfocitos B a células de centro germinal, proponemos que el defecto encontrado en los linfocitos B deficientes en RRas2 se debe a un ahogamiento metabólico que hace que estas células sean incapaces de cumplir las demandas energéticas a las que están sujetas. Además, nuestro trabajo muestra que la ruta de PI3K está relacionada con la actividad mitocondrial a través de la activación del complejo-quinasa mTORC1. Por tanto, sugerimos un modelo en el que RRas2 dirige la respuesta energética de los linfocitos B activados por un mecanismo dependiente de PI3K.

Finalmente, exploramos el papel de RRas2 en la linfomagénesis, dado que la mayor parte de linfomas B se originan precisamente en el centro germinal. Usando dos modelos de formación de tumores espontáneos (*Trp53*^{-/-} y *Eμ-myc*), demostramos que RRas2 juega un papel en el desarrollo de tumores de tipo linfoide y que su ausencia previene la formación de linfomas en favor de otros tipos de neoplasias. Adicionalmente, hemos descubierto que RRas2 participa en el desarrollo de linfocitos B y que los ratones deficientes en RRas2 muestran una acumulación de progenitores B tempranos en el estadio Pro-B. Este papel podría estar causando la aparición de linfomas B más inmaduros en el modelo *Eμ-myc*. Estos resultados sugieren que RRas2 podría estar actuando como efector de otras moléculas de superficie hasta ahora inexploradas y abre el camino para el estudio de otras funciones de esta GTPasa que deben ser abordadas en el futuro.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. La respuesta inmune humoral

Existen dos tipos de inmunidad que hacen frente a los microorganismos: la inmunidad innata, presente en todos los organismos, y la inmunidad adaptativa, que surgió más tarde evolutivamente con la aparición de los vertebrados. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa temprana, mientras que la inmunidad adaptativa o celular ocurre más tarde y se compone de células altamente especializadas. La activación del sistema innato depende del reconocimiento de estructuras compartidas por grupos de microorganismos afines y suministran una defensa rápida y eficaz contra las infecciones que no varía con las sucesivas exposiciones. El sistema adaptativo, sin embargo, se caracteriza por su alta especificidad frente a diversos agentes infecciosos y por su capacidad de recordar. Debido a su memoria, el sistema adaptativo es capaz de desarrollar una respuesta más potente y más rápida ante una segunda exposición a la sustancia extraña o antígeno. La memoria inmunológica del sistema adaptativo constituye la base de las vacunas. Por otro lado, su alta especificidad ante un número ilimitado de patógenos ha sido el objeto de numerosos estudios en las últimas décadas y ha dado lugar a importantes avances en todo el campo de investigación de la inmunología.

Las células que llevan a cabo la inmunidad adaptativa se denominan linfocitos, de los cuales existen dos tipos: los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos T (o células T) combaten los antígenos de patógenos intracelulares como virus, protozoos o algunas bacterias eliminándolos a ellos o a las células infectadas. Los linfocitos B (o células B) son los encargados de la **respuesta inmune humoral** que consiste en la generación de anticuerpos específicos que se liberan y se unen a los microorganismos patógenos extracelulares y sus toxinas y ayudan a eliminarlos. La especificidad de los anticuerpos producidos por los linfocitos B se adquiere a lo largo de la vida de los organismos a través de un sistema extremadamente adaptable. La comprensión de este fenómeno, también conocido como la maduración de la afinidad es de suma importancia ya que está relacionada con los procesos patológicos de asma y autoinmunidad. Esta tesis doctoral se centra precisamente en el estudio de los linfocitos B y más concretamente en este proceso de generación de anticuerpos específicos.

El receptor de células B o BCR puede ser secretado. La versión soluble del BCR es lo que constituye los anticuerpos propiamente dichos. El BCR a su vez está muy relacionado estructuralmente con el receptor de células T o TCR, aunque una de las principales diferencias entre ambos es que este último no se presenta en forma soluble. Todos los linfocitos B vírgenes (esto es, que no han contactado nunca con ningún antígeno) expresan el BCR anclado a la membrana, el cual se compone de una molécula

de inmunoglobulina (asociada a su vez a las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$) que puede ser de los subtipos IgM e IgD. Cuando una sustancia extraña entra en el organismo, el BCR del linfocito B virgen puede mantener el subtipo IgM o cambiar el tipo de inmunoglobulina a los subtipos IgG, IgA o IgE. Cada uno de estos subtipos de inmunoglobulinas tiene propiedades particulares que las hacen aptas para diferentes tareas en el proceso de eliminación de los microorganismos patógenos. Por otro lado, el BCR también experimenta un incremento en su especificidad y afinidad por el antígeno en cuestión, de manera que existe un “aprendizaje” de los linfocitos B que posteriormente podrá recordar en el caso de producirse una segunda exposición al mismo microorganismo.

El número de antígenos que pueden ser reconocidos por los anticuerpos del organismo es en principio ilimitado. La cuestión de cómo puede generarse una diversidad de esta magnitud a partir de un número limitado de genes ha sido uno de los problemas centrales de la inmunología durante décadas. Dos contribuciones han ayudado enormemente al esclarecimiento de este problema: la teoría de la selección clonal y el descubrimiento de la recombinación somática. La teoría de la selección clonal fue formulada por Frank Macfarlane Burnet (Burnet, 1976) y en ella se postulaba que cada linfocito B es capaz de producir un único tipo de anticuerpo. Según esta teoría, el contacto con el antígeno produce la selección de un sólo tipo de linfocito en base a su respectivo anticuerpo. Al seleccionarse, éste se clona y reproduce masivamente para asegurar que haya suficiente cantidad de anticuerpos para inhibir y prevenir la infección. La teoría de la selección clonal fue confirmada gracias al descubrimiento de la recombinación somática en los genes de las inmunoglobulinas entre los segmentos VDJ realizado por Susumu Tonegawa (Hozumi and Tonegawa, 1976). Tonegawa demostró que el material genético de los genes de las inmunoglobulinas puede editarse, reorganizarse y eliminar ciertos segmentos para dar lugar a la gran diversidad de anticuerpos existentes a partir de un número limitado de genes.

Posteriormente, estudiando los anticuerpos presentes en sueros de animales inmunizados se demostró que existía un proceso por el cual los anticuerpos aumentaban su afinidad por el antígeno con el tiempo, un fenómeno que se conoce como maduración de la afinidad (Eisen and Siskind, 1964). En los anticuerpos analizados, no solamente existía una recombinación de los segmentos VDJ sino que se veía como las regiones de la cadena variable de las inmunoglobulinas acumulaban mutaciones somáticas que mejoraban la afinidad de los anticuerpos hacia los antígenos con respecto a las codificadas por los clones originales de los linfocitos B progenitores.

Gracias a todos estos descubrimientos, hoy en día está bien establecido que los linfocitos B experimentan un proceso darwiniano en el que sólo los clones con mayor afinidad por el antígeno son seleccionados. Este proceso tiene lugar en las estructuras conocidas como **centros germinales**.

2. La reacción de los centros germinales

Los centros germinales (CG) son estructuras anatómicas que se forman en los órganos linfáticos secundarios, principalmente el bazo y nódulos linfáticos (Ilustración 1). Los CG emergen dentro de los folículos B cuando se produce un encuentro con un microorganismo (Nieuwenhuis and Opstelten, 1984). La observación de los centros germinales se remonta a 1884 cuando Fleming las describió como estructuras de órganos linfoides con células en división. En efecto, los centros germinales se forman después del contacto con un antígeno y constituyen los lugares de expansión clonal de los linfocitos B. El estudio de los linfocitos B de los centros germinales reveló que aquí tiene lugar también el proceso de hipermutación somática y de cambio de clase de las inmunoglobulinas (Jacob et al., 1991, Berek et al., 1991).

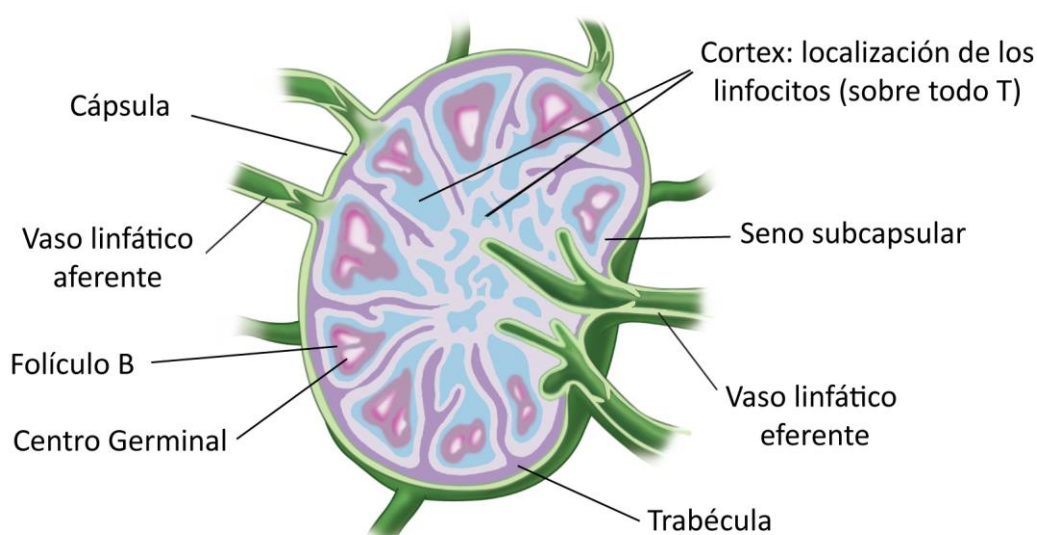


Ilustración 1. Estructura de un ganglio linfático.

Esquema de la vista longitudinal de la estructura interna de un ganglio linfático.

Desde entonces, y gracias a los últimos avances en microscopía, el campo de estudio de los centros germinales ha progresado enormemente, lo que ha permitido que hoy tengamos una idea bastante precisa de cómo ocurre la maduración de los linfocitos B en respuesta a un antígeno.

2.1. Poblaciones celulares dentro del centro germinal

En el centro germinal maduro podemos encontrar los siguientes tipos celulares:

- Linfocitos B de centro germinal
- Células dendríticas foliculares (FDC)
- Linfocitos T
- Macrófagos con cuerpos susceptibles de ser teñidos (TBM), especializados en fagocitar células B apoptóticas.

La gran mayoría de las células que componen el centro germinal maduro son **linfocitos B activados**. Los linfocitos B de centro germinal se diferencian de los linfocitos B vírgenes en varias características: son de mayor tamaño, tienen una morfología más polarizada y tienen una tasa de división muy alta (entre 6 y 12 horas). Los linfocitos B de CG pueden ser identificados por los marcadores extracelulares que expresan: altos niveles de Fas (o CD95), de ácido n-glicolilneuroamínico (que es reconocido por el anticuerpo GL7), de SIP₂ (Green et al., 2011), pérdida de IgD, pérdida del receptor Ebi2 (Gatto et al., 2009, Pereira et al., 2009) y cambio en la expresión de CD38 (modulación negativa en ratones y positiva en humanos). A nivel intracelular, el factor de transcripción Bcl6 se considera uno de los reguladores más críticos para la reacción de centro germinal. En linfocitos B de CG actúa como represor transcripcional de los siguientes genes:

- Reprime la expresión de Bcl-2, una molécula anti-apoptótica, de forma que mantiene los linfocitos B de CG en un estado muy proclive a la muerte celular programada (Ci et al., 2009).
- Reprime los genes p53 y ATR (Ranuncolo et al., 2007, Phan and Dalla-Favera, 2004) de forma que los linfocitos B de CG son especialmente tolerantes al daño en el ADN, algo esencial para mantener el alto nivel de mutaciones inducidas por la enzima AID y poder generar la diversidad de anticuerpos.
- Reprime a Blimp-1 (Shaffer et al., 2000), otro regulador clave de los centros germinales que promueve la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas (o productoras de anticuerpos profesionales).
- Reprime la expresión de algunos efectores del receptor de células B (BCR) y CD40 (Basso et al., 2010), posiblemente modulando la respuesta de los linfocitos B de CG a diferentes señales que se dan en la reacción de centros germinales.

Las **células dendríticas foliculares (FDC)** forman una red reticular en los folículos primarios y en los centros germinales. En los CG, las FDC se concentran en la zona clara, donde constituyen su principal marca anatómica en los estudios de microscopía. Las FDC son capaces de retener antígenos intactos en su superficie durante largos periodos de tiempo sirviendo de reservorios de antígenos para que éstos sean reconocidos por los linfocitos B. De esta forma, los linfocitos B de CG se seleccionan en base al

reconocimiento de sus inmunoglobulinas por estos antígenos. Además de esta función, las FDC secretan quimioquinas y citoquinas que atraen y mantienen a los linfocitos B de CG. En particular, las FDC secretan el ligando de CXCR5, CXCL13, que no sólo constituye el principal quimioatrayente de las células B de CG y de células T_{FH} sino que probablemente también desempeña un papel en la polarización entre zona clara y oscura (Allen et al., 2004). Entre las citoquinas que expresan las FDC también encontramos IL6 y BAFF, ambas esenciales para la reacción de CG (Wu et al., 2009). Sin embargo, la alteración de la función de las FDC sólo produce defectos en la maduración de la afinidad a niveles variables. En ausencia de FDC no se forman CG pero incluso en estas condiciones puede producirse cierto grado de maduración de la afinidad, si bien es cierto que para ello han de suministrarse dosis de antígeno mucho mayores que en condiciones de inmunización normales. Todos estos datos sugieren que probablemente las FDC sean esenciales para asegurar la maduración de afinidad en condiciones sub-óptimas pero prescindibles cuando hay gran disponibilidad de antígeno.

Los **linfocitos T** suponen sólo un pequeño porcentaje del total de células de los centros germinales y sin embargo son absolutamente fundamentales y desempeñan un papel crítico para enviar señales a los linfocitos B de CG. La población de linfocitos T de CG más estudiada son los linfocitos T cooperadores foliculares (T_{FH}). Los linfocitos T_{FH} son linfocitos $CD4^+$ que expresan el receptor CXCR5, necesario para la entrada en los folículos B (Ilustración 1). La interacción entre los linfocitos T_{FH} y los linfocitos B induce la formación y el mantenimiento de los centros germinales a través de las señales derivadas del contacto entre el receptor CD40L de los linfocitos T_{FH} y el CD40 de los linfocitos B y también a través de la secreción de IL4 y de IL21. El origen de los linfocitos T_{FH} ha sido objeto de extensos estudios durante los últimos años, y actualmente se ha llegado al consenso de que estas células pueden identificarse por la expresión combinada de CD4, CXCR5, ICOS, y PD1 (Haynes et al., 2007, Rasheed et al., 2006). Sin embargo ninguno de estos marcadores es exclusivo de las células T_{FH} . Tres trabajos publicados en el año 2009 demostraron el requerimiento de Bcl6 en el desarrollo de los linfocitos T_{FH} quedando así definitivamente constituida como una estirpe celular T independiente de los linfocitos T cooperadores Th1 y Th2 con las que se los había relacionado hasta ese momento (Johnston et al., 2009, Nurieva et al., 2009, Yu et al., 2009). Sin embargo, tampoco la expresión de Bcl6 es específica de los T_{FH} , ya que todas las células T $CD4^+$ en división lo expresan cuando interactúan con células dendríticas (Baumjohann et al., 2011). Por tanto, el campo de estudio de las células T_{FH} continúa en constante revisión. Los últimos resultados indican que incluso podemos hablar de diferentes subpoblaciones dentro de los linfocitos T_{FH} :

En primer lugar, los linfocitos pre- T_{FH} son células $CXCR5^+ BCL6^+$ que se encuentran en el borde T:B antes de que se formen los centros germinales, y por tanto previo al contacto con las células B (Lee et al., 2011). Esta población expresa altos niveles de Bcl6 y es importante para la respuesta extrafolicular temprana que tiene

lugar inmediatamente después del contacto con el antígeno. Estas células dan lugar a los linfocitos T_{FH} propiamente dichos (o T_{FH} de CG) en el momento en el que establecen contactos con los linfocitos B y se produce una expresión mantenida de Bcl6 en una segunda “oleada” transcripcional (Baumjohann et al., 2011).

En segundo lugar, los linfocitos T_{FH} de CG son los linfocitos T que primero se descubrieron en los centros germinales maduros y son esenciales para la formación y mantenimiento de los mismos. Se generan a partir de sus precursores pre-T_{FH} cuando éstos alcanzan una expresión mantenida de Bcl6 y se caracterizan por expresar los marcadores CXCR5, BCL6, PD-1, IL21, CD84 e ICOS (Chtanova et al., 2004). Estas células tienen la misión de proporcionar señales de selección y supervivencia a los clones de células B de la zona clara (centrocitos) una vez han mutado la región variable de sus inmunoglobulinas. La naturaleza de estas señales ha sido objeto de muchos estudios y hoy en día sabemos que las interacciones entre los linfocitos B y T en el centro germinal son bidireccionales, de forma que existe una co-dependencia por parte de ambos tipos celulares. Cabe resaltar que en dicha interacción es esencial la señalización producida por el contacto entre el correceptor CD40 de las células B de CG y CD40L de las T_{FH} (Han et al., 1995). La producción de citoquinas por parte de los linfocitos T_{FH} también juega un papel fundamental en el correcto desarrollo de la reacción de centros germinales. Como se ha comentado anteriormente, la IL21 es esencial para la diferenciación y la función de las células T_{FH} (Nurieva et al., 2008, Vogelzang et al., 2008). Esta citoquina actúa sobre los linfocitos B induciendo la expresión de Bcl6, pero se ha demostrado que también actúa de forma autocrina en el mantenimiento de la población T_{FH}. Otras citoquinas como IL4, IL2 o IFN γ son también muy importantes, aunque sus niveles de expresión varían en cada caso. Por ejemplo, se sabe que los niveles de expresión de IFN γ por parte de los linfocitos T_{FH} son mucho menores que otros subtipos de linfocitos T CD4⁺ y ello contribuye a regular el número de T_{FH}, que de otro modo provocaría importantes alteraciones autoinmunes como ha sido demostrado en modelos de lupus en ratón (Lee et al., 2012).

En tercer lugar, las células asesinas naturales Tfh (NK Tfh) provienen de la misma estirpe de diferenciación que los linfocitos T_{FH} y de hecho expresan también los marcadores CXCR5 y PD-1 (Detre et al., 2012). La formación de células NK Tfh depende de Bcl6, de CD28 y de las interacciones con los linfocitos B. Las células NK Tfh aceleran la producción de anticuerpos dando lugar a núcleos tempranos de células plasmáticas extrafoliculares y a centros germinales que involucionan rápidamente (Chang et al., 2012, King et al., 2012). Estos CG tempranos dan lugar a clones de linfocitos B de muy limitada afinidad por el antígeno, constituyendo probablemente una importante primera y rápida línea de acción previa a la formación de los CG maduros.

Recientemente también se ha descrito otra estirpe de linfocitos T implicada en la reacción de los centros germinales que proviene de una línea de diferenciación distinta de las T_{FH}. Se trata de células T foliculares reguladoras (Tfr), que además de

expresar CXCR5 y PD-1 expresan Foxp3 y comparten muchas características fenotípicas con los linfocitos T reguladores. Bcl6 también es fundamental para el desarrollo de las células Tfr. Respecto a su función, las células Tfr parecen estar implicadas en la regulación negativa de los compartimentos B y T_{FH} de los CG. Se ha observado que en ausencia de células Tfr se generan células B no específicas para el antígeno con el que se ha inmunizado (Groux et al., 1997), lo cual sugiere que las células Tfr pueden estar desempeñando una importante función en la inhibición de clones auto-reactivos de linfocitos B, bien porque hayan recibido estímulos de linfocitos T no específicos, o bien como consecuencia de las mutaciones somáticas al azar que se producen en el centro germinal.

Además de las distintas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores foliculares, existe un tipo de linfocitos T CD8⁺ que se describió en el año 2010 (Kim et al., 2010) y que, al igual que el resto de linfocitos T CD8⁺ citolíticos, son dependientes de la expresión de IL15 y perforina. Sin embargo, también expresan marcadores típicos de linfocitos T de CG como CXCR5, ICOSL y CD44. Se ha demostrado que estas células están especializadas en suprimir la población T_{FH}, lo que de manifiesto la importancia del mantenimiento del control de los centros germinales.

Los **macrófagos TBM** se encargan de fagocitar y eliminar las células B apoptóticas que se producen en el CG. La importancia de esta población queda manifiesta en el hecho de que la interferencia con la función de las células TBM provoca el desarrollo de síntomas compatibles con la enfermedad del lupus (Ramiscal and Vinuesa, 2013).

2.2. Dinámica de la respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T

En condiciones libres de patógenos, los órganos linfoides secundarios tales como el bazo y los ganglios linfáticos contienen folículos primarios compuestos por linfocitos B vírgenes o naif, esto es, que nunca han tenido contacto con ningún antígeno. En función del modelo experimental utilizado los tiempos que transcurren en cuanto a la formación de los centros germinales puede variar. A continuación se detalla la dinámica establecida en condiciones de inmunización estándar (péptidos conjugados con haptenos y con adyuvante, o con eritrocitos de carnero) y en el modelo de ratón, que son las condiciones que se han usado a lo largo de todo este trabajo. Un resumen de esta dinámica puede verse la Ilustración 2.

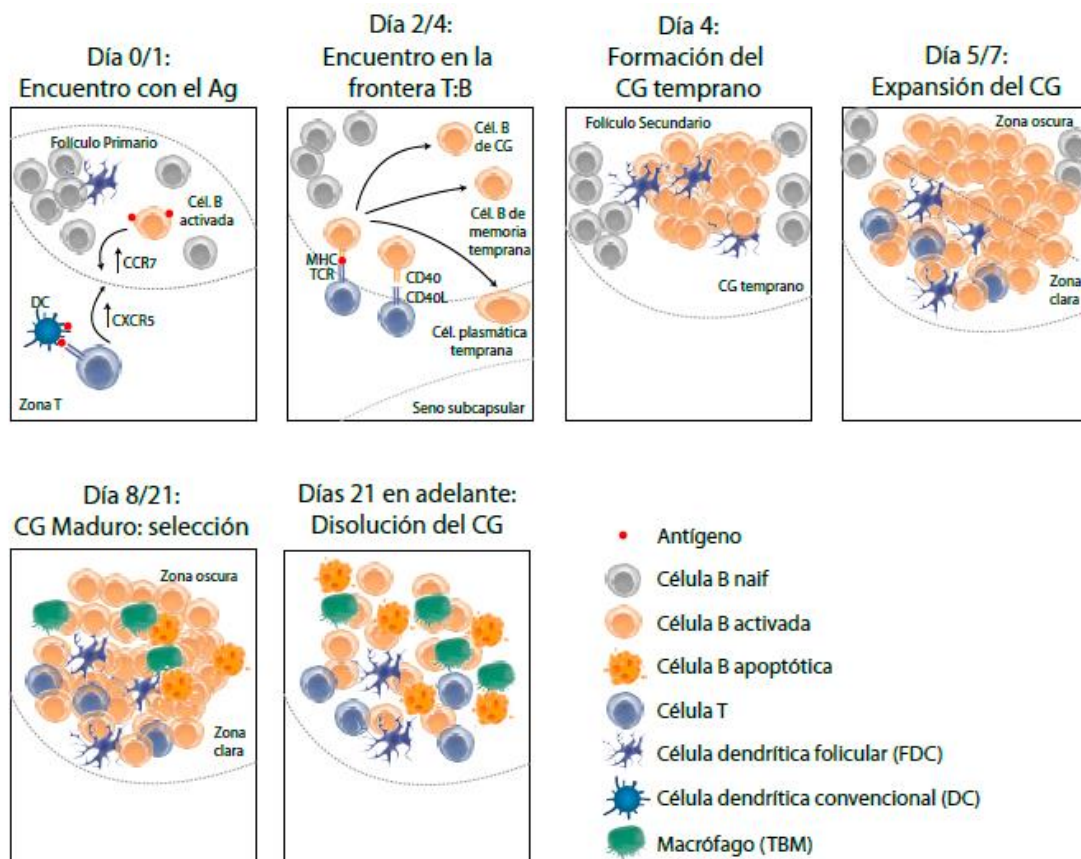


Ilustración 2. Esquema de la dinámica de la formación de un centro germinal.

En el dibujo se detalla cómo se forma un centro germinal así como los tiempos que toma cada una de las fases explicadas en el texto.

Adaptado (Victoria, 2014 y De Silva and Klein, 2015).

Cuando una sustancia extraña entra en el organismo células especializadas (células dendríticas convencionales) la transportan a través de la sangre o del sistema linfático hasta los folículos primarios, donde se encuentra el reservorio de linfocitos B vírgenes. En este proceso, que puede durar en torno a 24 horas, los linfocitos B que reconocen el antígeno que ha llegado, empiezan a sobre-expresar el receptor de quimioquinas CCR7 y a migrar hacia la zona T. A partir de aquí, los linfocitos B que han reconocido el antígeno pueden tomar una de las dos siguientes vías: la respuesta folicular, en la que los linfocitos B darán lugar a los centros germinales (CG); y la respuesta extrafolicular, en la que abandonan la zona T para ocupar los cordones medulares de los ganglios o el bazo para formar focos de células plasmáticas de vida corta que producen anticuerpos de baja afinidad. Los linfocitos B que toman la vía folicular desplazan a los linfocitos B vírgenes no reactivos hacia lo que se conoce como zona del manto. A su vez, los linfocitos T $CD4^+$ que reconocen el antígeno en forma de péptido presentado en el contexto del MHC de clase II empiezan a proliferar. Un subconjunto de estos linfocitos T $CD4^+$ son los que a partir de este momento empezarán

a sobreexpresar Bcl6, CD40L y migrarán hacia el folículo B desarrollando el fenotipo CXCR5⁺ PD1⁺ característico de los T_{FH} comentados anteriormente.

En la siguiente fase, que transcurre entre 2 y 4 días tras el contacto con el antígeno, los linfocitos T y B que han sido activados salen al encuentro en la frontera entre la zona T y el folículo de células B. En este punto los linfocitos B ya han internalizado el antígeno, lo han procesado y lo presentan en su superficie en forma de pMHC (MHC unido al péptido derivado del procesamiento antigénico). Las interacciones correspondientes que tienen lugar entre los linfocitos B que presentan el antígeno y los linfocitos T promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos B. En esta fase, solamente aquellos linfocitos B con mayor afinidad por el antígeno podrán progresar en la reacción de CG. Se ha demostrado que la competición entre distintos clones de células B por las señales procedentes de las células T es el elemento clave (Schwickert et al., 2011). Este proceso se denomina selección clonal y se detalla en el punto 2.3. En este momento, el linfocito B puede tomar 3 posibles destinos: convertirse en un linfocito B de CG, migrar al centro del folículo y formar un CG temprano; convertirse en células plasmáticas (productoras de anticuerpos profesionales) tempranas, desplazarse fuera del folículo y comenzar a secretar anticuerpos; o se convertirse en células de memoria tempranas. Tanto las células plasmáticas tempranas como las células de memoria tempranas tienen una afinidad limitada por el antígeno ya que no han pasado por la reacción de centro germinal, pero construyen una primera respuesta humoral importante para la defensa del organismo contra el patógeno.

A partir del día 4 los linfocitos B migran al centro del folículo dando lugar a los llamados folículos secundarios, donde forman el CG temprano. Sin embargo, es importante resaltar que la sobreexpresión de proteínas relacionadas con el CG, fundamentalmente Bcl6 fuera del folículo es lo que condiciona la decisión de los linfocitos T y B específicos de antígeno de formar el CG (Kerfoot et al., 2011, Kitano et al., 2011).

Ya en el centro germinal, y a los 5-7 días tras el contacto con el antígeno, los linfocitos B comienzan a proliferar extensamente e inician la hipermutación somática dirigida por la citidina-deaminasa inducida por activación (AID). Esto tiene lugar en un contexto en el que las células dendríticas foliculares (FDC) están formando la red que sirve como reservorio de los complejos inmunes conteniendo el antígeno con el que se ha inmunizado. Debido a la rápida proliferación de los linfocitos B en esta fase, el centro germinal ya está formado por una gran mayoría de linfocitos B que forman un cúmulo y los linfocitos T representan sólo un pequeño porcentaje del total de células.

Aproximadamente en el día 7 tras el contacto con el antígeno tiene lugar el pico donde más linfocitos B de CG se pueden detectar. A partir de aquí y hasta aproximadamente el día 21 post-inmunización (p.i) se mantiene el llamado centro germinal maduro. La característica anatómica más evidente de esta estructura naciente

es la diferenciación entre dos compartimentos: la zona clara y la zona oscura. La zona clara se encuentra en la periferia, cerca de la zona marginal del folículo; mientras que la zona oscura consiste en una alta densidad de linfocitos B (por cuya apariencia al microscopio toma el nombre de zona oscura). En la zona clara residen las FDC, los linfocitos B de zona clara (también llamados centrocitos), y los linfocitos T_{FH} . Asimismo, la zona oscura consiste fundamentalmente de linfocitos B de zona oscura (también llamados centroblastos) en constante proliferación. Los macrófagos TBM descritos más arriba y que se encargan de fagocitar a los linfocitos B apoptóticos pueden encontrarse en cualquier zona del CG. Recientemente, se ha descrito la presencia en la zona oscura de una red de células reticulares que expresan el receptor de CXCL12, por lo que pueden estar desempeñando un papel en la migración de los linfocitos B desde la zona clara hacia la zona oscura (Bannard et al., 2013, Rodda et al., 2015). La migración cíclica de los linfocitos B entre la zona clara y oscura constituye en sí el proceso de maduración de la afinidad que se describe en el punto 2.3.

Tras todas estas fases, a partir del día 21 post-inmunización los centros germinales empiezan a disiparse: los linfocitos B disminuyen en número, se encuentran menos concentrados en el centro del folículo, y los macrófagos TBM son prácticamente indetectables. La disolución completa de los CG puede variar desde pocos días hasta varios meses dependiendo de cómo suceda el contacto con el antígeno, pero se sabe todavía muy poco sobre los mecanismos que regulan el colapso de los CG.

2.3. El proceso de selección clonal

De acuerdo con diferentes estudios, a partir de un número relativamente alto de clones de linfocitos B pre-existentes en los folículos, sólo de uno a tres clones son finalmente seleccionados para entrar en la reacción de los centros germinales (Jacob et al., 1993). Los mecanismos por los cuales tiene lugar esta selección en las primeras etapas de la formación de los centros germinales ha sido objeto de extensos estudios y actualmente se sabe que el punto más crítico es la competencia entre los clones B por las señales provistas por los linfocitos T (Schwickert et al., 2011 Gitlin et al., 2015).

Tras este primer paso de competición entre clones diferentes de linfocitos B, una vez que se han seleccionado los clones que van a entrar en la reacción de centro germinal (5-7 días tras el contacto con el antígeno), tiene lugar otro proceso de competición “intraclonal” entre diferentes variantes que se han generado a partir de un solo linfocito B inicial (Jacob et al., 1993). De esta forma, una vez que queda establecido un centro germinal, dentro de él progresa un clon individual, y diferentes clones de linfocitos B evolucionan de forma simultánea en cada CG que se ha generado. Además, recientemente se ha comprobado que, a pesar de esta premisa, un linfocito B procedente de un CG puede invadir otro CG pre-existente si éste presenta una ventaja

competitiva con respecto a la unión del antígeno o al acceso por los linfocitos T (Schwickert et al., 2009). En cualquier caso, la invasión de otros CG ocurre sólo en circunstancias especiales, probablemente en lugares como la mucosa intestinal donde hay una exposición constante al antígeno (Bergqvist et al., 2013), lo que revela que los centros germinales son estructuras mucho más dinámicas de lo que se pensaba en un principio.

Maduración clonal dentro del centro germinal

Una vez establecido lo que podemos llamar un centro germinal maduro, a partir del día 6-7 tras el contacto con el antígeno, y durante un periodo de tiempo que puede durar hasta el día 21, tiene lugar la selección clonal. Esta selección se basa fundamentalmente en la maduración de la afinidad de la inmunoglobulina del linfocito B inicial por el antígeno en cuestión, y tiene lugar entre las zonas clara y oscura comentadas anteriormente. La polarización del centro germinal en estas dos zonas sucede gracias a la generación de un gradiente de las quimioquinas CXCL13 y CXCL12, cuyos receptores se encuentran sobreexpresados en la zona clara y oscura respectivamente (Allen et al., 2004). Se ha comprobado que la separación espacial entre estas dos zonas es fundamental para la maduración eficiente de la afinidad. Gracias a la introducción de la microscopía confocal intravital, tres estudios publicados simultáneamente comprobaron que los linfocitos B necesitan moverse de forma cíclica entre las zonas clara y oscura (Allen et al., 2007, Schwickert et al., 2007, Hauser et al., 2007), confirmando así la teoría conocida como “teoría de la re-entrada en el ciclo” propuesta años antes en diversos modelos matemáticos (Kepler and Perelson, 1993, Oprea and Perelson, 1997). En la Ilustración 3 se muestra un esquema del movimiento de los linfocitos B dentro del centro germinal.

Según el modelo actual, en la zona clara tienen lugar los procesos de selección positiva que hacen que un determinado clon de linfocito B migre a la zona oscura, donde podrá proliferar y experimentar una nueva fase de hipermutación somática, continuar un nuevo ciclo y atravesar así sucesivas rondas de selección. En ese proceso de selección positiva se sabe que un factor fundamental es la competencia por un número muy limitado de linfocitos T_{FH} que proporcionan señales de supervivencia a los linfocitos B (Victora et al., 2010). A su vez, esto se traduce en que los linfocitos B que sean capaces de adquirir y presentar más antígeno expuesto por las células dendríticas foliculares (FDC) estarán mejor cualificadas para competir por los T_{FH} . Estos datos conceden una importancia primordial a los linfocitos T en el CG en detrimento del posible papel que pudiera desempeñar el BCR como transmisor de señales, lo cual ha generado un interesante debate científico en el campo.

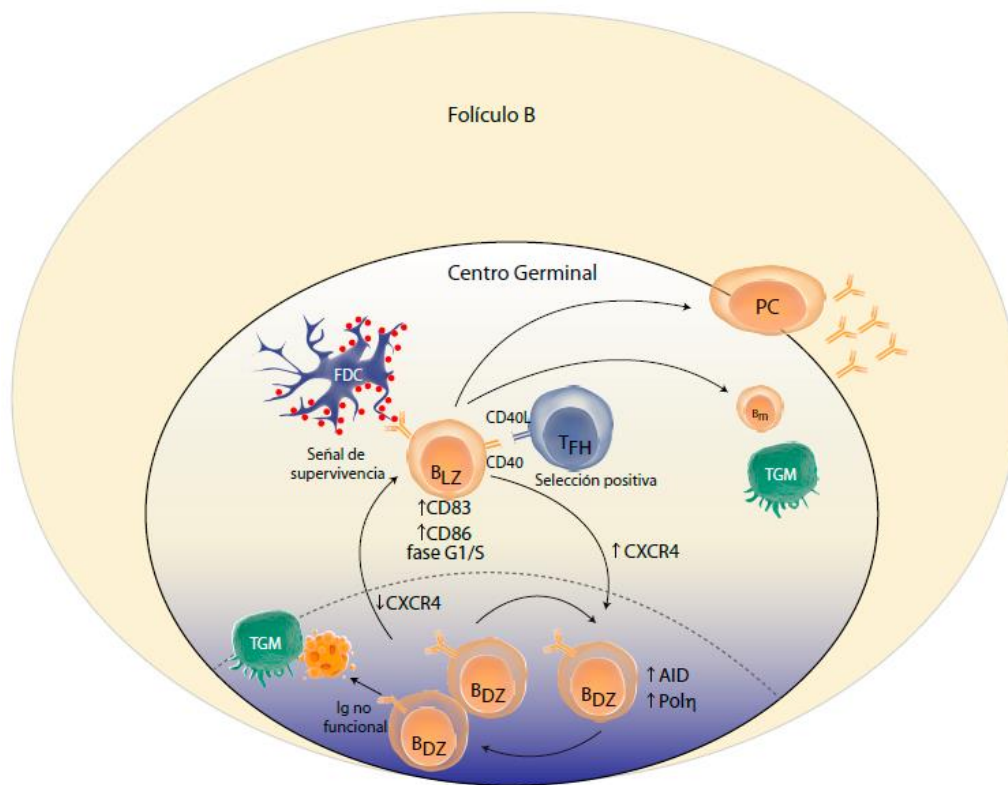


Ilustración 3. Esquema de un centro germinal (CG) maduro en un folículo B.

En el dibujo se muestra la organización de un CG maduro y las poblaciones celulares presentes en el mismo, así como las principales interacciones que ocurren entre ellas gracias a las cuales se producen los eventos de hipermutación somática, selección clonal y diferenciación de linfocitos B de CG a células plasmáticas y células B de memoria.

Adaptado (Victora and Nussenzweig, 2012).

Además, recientemente Shlomchik y colaboradores han publicado un trabajo donde se demuestra que la fosforilación de las proteínas efectoras más inmediatas de la ruta de señalización del BCR es prácticamente nula en los linfocitos B de CG. Estos descubrimientos, atribuidos a una alta actividad fosfatasa en esta población de CG, apoyan la idea de que el papel del BCR en el proceso de selección positiva queda limitado a su papel como presentador de antígeno (Khalil et al., 2012).

Los sucesos que ocurren durante la etapa en la que los linfocitos B se encuentran en la zona oscura han sido mucho menos estudiados. Se sabe que la fuerza de la interacción entre los linfocitos B de CG y los T_{FH} determina el número de divisiones que la célula B experimentará en la zona oscura así como el tiempo que permanecerá en la misma (Gitlin et al., 2014, Gitlin et al., 2015). Esto se ha determinado gracias a experimentos donde se ha forzado la interacción T-B en el CG elevándose así la estancia de los linfocitos B en la zona oscura de 4 a 24-48 horas (Victora et al., 2010). Por otro lado, el grupo de Jason Cyster ha demostrado en un elegante modelo de ratones deficientes para el receptor CXCR4, que los linfocitos B pueden hacer la transición de zona oscura a zona clara independientemente de estímulos externos, apoyando así la

idea de un “reloj interno” e intrínseco de los linfocitos B de CG (Bannard et al., 2013). De esta forma podría suceder que en cada zona del CG estén actuando mecanismos diferentes, siendo más importantes los estímulos externos procedentes de las células T_{FH} durante la selección en la zona clara y los estímulos intrínsecos durante el periodo de la zona oscura.

3. Centros germinales y linfomagénesis

La reacción de los centros germinales es fundamental para que nuestro sistema inmune nos proteja de los microorganismos de forma eficiente. Sin embargo, la gran mayoría de linfomas y leucemias de tipo B en humanos tiene como origen precisamente el centro germinal. Esto se debe a la extensa proliferación a la que se ven sometidos los linfocitos B de CG y a las numerosas alteraciones cromosómicas mediadas por la enzima AID. Los errores introducidos por dicha enzima son la base de la hipermutación somática y del cambio de clase de las inmunoglobulinas. Sin embargo, es primordial que este proceso esté muy finamente regulado ya que errores ocasionales pueden provocar alteraciones genéticas en los linfocitos B de CG que den lugar a una proliferación descontrolada que desemboque en un proceso tumoral.

De hecho, la expresión de algunos de los principales genes involucrados en la reacción de los centros germinales, como *MYC*, *BCL2*, *MCL6* y *PRDM1* (que codifica Blimp1) se ha encontrado alterada en cáncer (Klein and Dalla-Favera, 2008, Shaffer et al., 2012). Los genes que codifican *BCL6* y *CD95*, dos de los marcadores clave de los linfocitos B de CG, albergan con frecuencia mutaciones en un porcentaje considerable de células B de CG y células B de memoria que no son malignas (Shen et al., 1998, Muschen et al., 2000). Este hallazgo indica que estos genes a menudo son diana de la maquinaria de hipermutación somática que opera en los linfocitos B normales durante la reacción de CG, con el riesgo que ello supone en cuanto al desarrollo de linfomas. De hecho, aproximadamente el 20% de los linfomas derivados de CG contienen mutaciones inactivadoras de *CD95*, de forma que las células se vuelven inmunes a las señales pro-apoptóticas mediadas por este receptor (Gronbaek et al., 1998).

Por otro lado, en la patogénesis de los linfomas también se han encontrado mutaciones inactivadoras en genes supresores tumorales como *TP53* o el gen que codifica para el inhibidor de la vía de $\text{NF}\kappa\text{B}$ $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Estos eventos vuelven a reforzar la idea de que los linfocitos B de CG son mucho más permisivos a tolerar mutaciones oncogénicas que cualquier otra célula normal (Kuppers, 2005). Los virus también ejercen un papel pro-tumoral en algunos tipos de linfoma: el caso más conocido es el del virus de Epstein-Barr (EBV), que se cree responsable de prácticamente la totalidad de los linfomas de Burkitt, y de aproximadamente el 40% de los casos de linfoma de Hodgkin (Kuppers, 2003). En general, la alteración de todos estos genes tiene efectos

pro-proliferativos y pro-supervivencia y también pueden llegar a inhibir la diferenciación terminal de los linfocitos B de CG hacia células plasmáticas maduras o de memoria.

Otro de los hallazgos más frecuentes en linfomas B es la presencia de translocaciones cromosómicas en las que se encuentran implicados un fragmento del locus de la inmunoglobulina (Ig) y un fragmento de un oncogén. Como consecuencia, el control de la expresión del oncogén en cuestión pasa a estar mediada por el locus de la Ig, lo que implica una expresión constitutiva en la célula B. Se han identificado tres tipos de translocaciones en este sentido:

- Translocaciones ocurridas durante la recombinación VDJ: están asociadas a roturas cromosómicas adyacentes al segmento J (J_H), o a la zona de unión entre los segmentos D y J (D_HJ_H) de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En este caso específico, lo más probable es que la translocación tenga lugar durante el desarrollo temprano de los linfocitos B en la médula ósea que es cuando tiene lugar la recombinación VDJ. Este tipo de translocación se ha observado por ejemplo con el locus *BCL2* (translocación $t(14;18)$ *BCL2/IgH*) en el linfoma folicular (Jager et al., 2000).
- Translocaciones ocurridas durante la hipermutación somática: en este caso los puntos de rotura del ADN se encuentran adyacentes a los genes V(D)J previamente recombinados. Esto, junto con la aparición de mutaciones somáticas en la región variable, indica que la translocación ha ocurrido durante el proceso de hipermutación somática del CG, el cual está asociado con roturas en las hebras de ADN (Goossens et al., 1998).
- Translocaciones ocurridas durante el cambio de clase de las Ig: se caracterizan por presentar puntos de rotura en la parte constante de la cadena pesada de las Ig (IgH), en donde se introducen roturas de ADN durante el cambio de clase.

Los mecanismos que operan sobre la rotura en el ADN en la región de los oncogenes implicados en estas translocaciones no están del todo claras, pero algunos estudios apuntan a que podrían ser responsables las mismas enzimas que actúan en los procesos de recombinación y mutación del locus de las inmunoglobulinas. Por ejemplo, en el caso del linfoma folicular, se ha demostrado que la enzima RAG, implicada en la recombinación V(D)J, produce también la escisión génica sobre el locus *BCL2* (Raghavan et al., 2004). Otros ejemplos notables son la translocación $t(11;14)$ *BCL-1/IgH* en el linfoma de manto (Tsujimoto et al., 1988), la translocación $t(1;14)$ *BCL9/IgH* del linfoma linfoblástico agudo, y la translocación $t(1;14)$ *BCL10/IgH* en el linfoma de tejido linfático asociado a mucosa (MALT) (Willis et al., 1998, Zhang et al., 1999).

Es interesante que los sucesos de translocación cromosómica que implican genes de las inmunoglobulinas ocurren en la mayoría de los casos en el alelo no

funcional del BCR, lo que indica que incluso los linfocitos B tumorales que albergan translocaciones cromosómicas dependen de la expresión del BCR para su supervivencia (Lam et al., 1997).

Tanto los procesos de mutación aberrante como las translocaciones cromosómicas ocurren casi de manera exclusiva en el CG, durante los procesos de hipermutación somática y cambio de clase de las inmunoglobulinas. Esta puede ser la causa principal por la cual los linfocitos B de CG o sus derivados constituyen el origen de la mayoría de linfomas B, y por la cual la incidencia de linfomas de origen T en la población es mucho menor.

4. Vías de señalización de los linfocitos B

En la superficie de los linfocitos B se expresan una serie de receptores celulares (BCR, CD40, BAFFR) capaces de iniciar cascadas de señalización intracelular. Estas vías de señalización constituyen el eje básico de la activación de los linfocitos B cuando éstos reconocen un antígeno a través de su receptor BCR, aunque también existen ciertas rutas independientes del reconocimiento antigénico (señalización tónica o basal) que son también importantes para el desarrollo de los linfocitos B y su homeostasis. Puesto que en este trabajo se van a estudiar las rutas de señalización mediadas por la GTPasa RRas2 en linfocitos B, vamos a introducir las principales rutas de señalización que operan en los mismos.

4.1. Señalización mediada por el BCR

El BCR se compone de una molécula de inmunoglobulina que por sí sola no es capaz de transmitir señales hacia el interior de la célula. Para ello, el BCR se encuentra asociado a su vez a un heterodímero formado por las cadenas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ (Ilustración 4). Cada una de ellas contiene en sus colas citosólicas un Motivo de Activación basado en Tirosinas del Inmunorreceptor (de sus siglas en inglés, ITAM). Estos motivos están compuestos por dos residuos de tirosina separados por una región de 9 a 12 aminoácidos. La secuencia canónica de los ITAM es $YXX[L/V]X_{6-9}YXX[L/V]$, donde Y son tirosinas, L son leucinas, V son valinas, y X son cualquier aminoácido. $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ contienen cada uno un único ITAM, por lo que el BCR cuenta con un total de 2 secuencias ITAM. Cuando el BCR reconoce un antígeno, los receptores tienden a agregarse y las tirosín-quinazas de la familia Src (Blk, Fyn, o Lyn) fosforilan a las secuencias ITAM. Gracias a su posición perfectamente espaciada, las tirosinas fosforiladas de los ITAM constituyen los sitios de unión para los dominios SH2 de la quinasa Syk. Al activarse Syk, las quinazas de la familia Src también la fosforilan, lo que favorece un bucle de retroalimentación positiva.

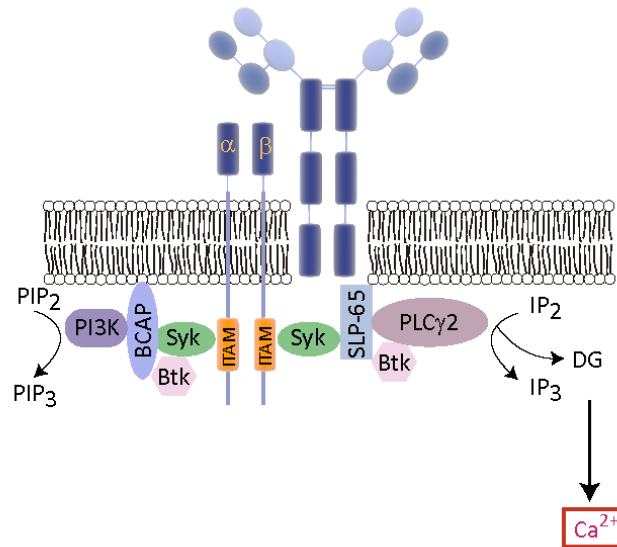


Ilustración 4. Esquema del Receptor de Células B (BCR).

En el dibujo se muestra la estructura del BCR, compuesto por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina, dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, y dos cadenas Igα e Igβ asociadas. Por debajo del receptor, se muestran los principales interactores del mismo, que son activados cuando el BCR reconoce una sustancia extraña, así como las principales rutas de señalización en respuesta a la activación del BCR.

Syk activa una serie de rutas de señalización que se encuentran reguladas por proteínas adaptadoras. En el caso de los linfocitos B, SLP-65 (también llamada BLNK) desempeña un papel fundamental como “andamio” para otras proteínas efectoras, como por ejemplo proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina, la fosfolipasa C, y otras tirosín-quinetas como Btk. Por último, el co-receptor CD19 también se asocia al BCR en la activación por reconocimiento del antígeno, formándose en suma un gran complejo señalizador. Este complejo, o “señalosoma” pondrá en marcha una serie de cascadas intracelulares que mediarán procesos de supervivencia, proliferación, o diferenciación, dependiendo del estado de maduración de la célula, la naturaleza del antígeno, la duración o magnitud de la interacción, y también de las señales que procedan de otros co-receptores como CD40, BAFFR, o IL21R.

A continuación vamos a analizar las principales rutas de señalización asociadas al BCR que tienen lugar durante la activación de los linfocitos B.

- **Ruta de PI3K**

La quinasa PI3K es uno de los principales efectores de los linfocitos B. PI3K genera fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP₃) a partir de fosfatidilinositol-2-fosfato (PIP₂), y el PIP₃ resultante transmite señales intracelulares cascada abajo. La activación de del PI3K

se ha atribuido mayoritariamente al co-receptor CD19, ya que éste tiene un sitio de unión al dominio SH2 de la subunidad p85 α de PI3K. Sin embargo, el grupo de Klaus Rajewsky observó que en ausencia de p85 α se produce un defecto en el desarrollo B que es mucho más severo que en ausencia de CD19, lo cual sugería que podría haber otras moléculas participando en la activación de PI3K (Rickert et al., 1995). En efecto, años más tarde se identificó una molécula adaptadora adicional llamada BCAP que es fosforilada por Syk y Btk y que es capaz de unirse a la subunidad p85 de PI3K (Okada et al., 2000). A su vez, BCAP activa la vía de PI3K/Akt, promoviendo así la proliferación y supervivencia de los linfocitos B así como la activación de JNK tras el contacto del BCR con el antígeno (Okada et al., 2000). También se ha propuesto que BCAP está implicada en la activación de PLC γ 2 a través de un mecanismo independiente de fosforilación (Yamazaki et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado que BCAP es reclutado por el adaptador Nck a la subunidad Ig α fosforilada (Castello et al., 2013).

Otro elemento regulador fundamental en la ruta de PI3K es Vav. La familia de proteínas Vav (Vav1, Vav2, y Vav3) son factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) citoplasmáticos para las GTPasas de la familia Rho. La familia Vav es indispensable para el flujo de Ca²⁺ inducido por el BCR, y es crítica para el correcto desarrollo B y la función del sistema inmune adaptativo (Swat and Fujikawa, 2005). Vav3 modula la función de PI3K y la movilización del calcio a través de Rac1, indicando un papel de Vav3 en la regulación de la respuesta B promoviendo una producción sostenida de PIP₃ y por tanto un flujo de calcio sostenido (Inabe et al., 2002). Vav3 también se une a Grb2 y BLNK induciendo de nuevo la activación de Rac1 en respuesta a la estimulación del BCR. Grb2 y SLP-65 participan en la localización de Vav en membrana, contribuyendo por tanto en la óptima activación de las células B y formando así parte de un “microseñaloma” donde PLC γ 2, SLP-65, Btk y Vav se asocian para transducir señales (Weber et al., 2008).

- **Ruta de PLC γ 2**

Tras la activación del BCR, la quinasa Syk es reclutada a los ITAM fosforilados de Ig α e Ig β , y ésta se activa siendo uno de sus sustratos SLP-65, que a su vez se une a PLC γ 2 y Btk. PLC γ 2 es responsable de la producción de diacilglicerol (DG) y de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), ambas moléculas pequeñas que actúan como mensajeros secundarios en la transmisión de señales. El IP₃ producido por PLC γ 2 se une al receptor de IP₃ (IP₃R) de la membrana del retículo endoplásmico, lo que conlleva la liberación del Ca²⁺ almacenado en el lumen reticular. Las cantidades de Ca²⁺ liberadas al citoplasma por esta vía son de por sí insuficientes, pero al vaciarse las reservas del retículo, esto promueve la entrada de más calcio desde el exterior celular (Liou et al., 2005). En este bucle de retroalimentación positiva la proteína STIM1 desempeña un importante papel ya que induce la activación de los

canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Zhang et al., 2005). Respecto al mecanismo de regulación de esta ruta, se sabe que Cbl ejerce un papel clave a través de su unión a varias moléculas señalizadoras como PTKs, moléculas adaptadoras (Grb2) y moléculas efectoras como precisamente PI3K o Vav (Kurosaki, 2011). Uno de los factores de transcripción más estudiados en linfocitos relacionados con esta vía es NFAT (Factor Nuclear de células T Activadas), que se activa en respuesta a Ca^{2+} . NFAT es una proteína citosólica que requiere un incremento continuo de Ca^{2+} para permanecer en el núcleo celular. Entre las dianas de NFAT en linfocitos B y relacionado con la reacción de los centros germinales se encuentra el Factor de Regulación del Interferón 4 (IRF4), uno factor crítico para la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas (Klein et al., 2006).

- **Ruta de NFκB**

NFκB es una familia de factores de transcripción implicados en el control de numerosos procesos celulares tales como el crecimiento, la proliferación y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Todos los miembros de la familia NFκB comparten la característica de contener un dominio llamado dominio de homología Rel (RH). Existen 5 miembros de la familia NFκB: RelA, RelB, c-Rel (o NEMO), p100 y p105. Los 3 primeros miembros contienen un dominio de transactivación en la parte C-terminal de la proteína. Por otro lado, p100 y p105 son precursores que necesitan un procesamiento antes de dar lugar a sus respectivas subunidades maduras o activas. Este procesamiento está mediado por la vía de la ubiquitina/proteasoma, responsable de la degradación selectiva de la región C-terminal de p100 y p105 que contiene repeticiones de ankirina, tras lo que se generan las subunidades p52 y p50 respectivamente. Ni p52 ni p50 son capaces de activarse por sí mismas, por lo que requieren encontrarse unidas en forma de dímero a alguna de las proteínas Rel para ejercer su función.

En condiciones de reposo, los dímeros de NFκB se encuentran retenidos en el citosol mediante su unión a inhibidores de la familia IκB. La estimulación de los receptores de antígeno, entre ellos el BCR, activa al complejo IKK compuesto a su vez por IKKα, IKKβ, e IKKγ. Este complejo es responsable de la fosforilación de IκB, lo que induce su degradación, liberando a los miembros de NFκB de forma que éstos pueden entonces translocarse al núcleo (Hacker and Karin, 2006).

Existen dos vías principales de activación de NFκB. **La vía clásica o canónica** se induce por multitud de estímulos fisiológicos como señales procedentes de receptores de citoquinas (receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR), receptor de IL1 (IL1R)), receptores de reconocimiento de patrones (como el TLR4), o también receptores de

antígeno. La vía canónica depende de IKK β y de NEMO, que fosforilan a I κ B de forma que se permite la translocación al núcleo del heterodímero p50-p50. **La vía alternativa o no canónica** depende, sin embargo, de la fosforilación mediada por IKK α de p100, que se encuentra unido a RelB. Esta fosforilación la realiza la quinasa NIK, una quinasa específica de la vía alternativa. Esto desencadena el procesamiento de p100 a p52, dando lugar al heterodímero p52-RelB. La señalización a través de la vía no canónica de NF κ B se induce por miembros específicos de la familia de citoquinas TNF como el ligando de CD40, BAFF o la linfotoxina- β (Oeckinghaus et al., 2011). Un esquema de las vías de señalización de NF κ B se muestra en la Ilustración 5.

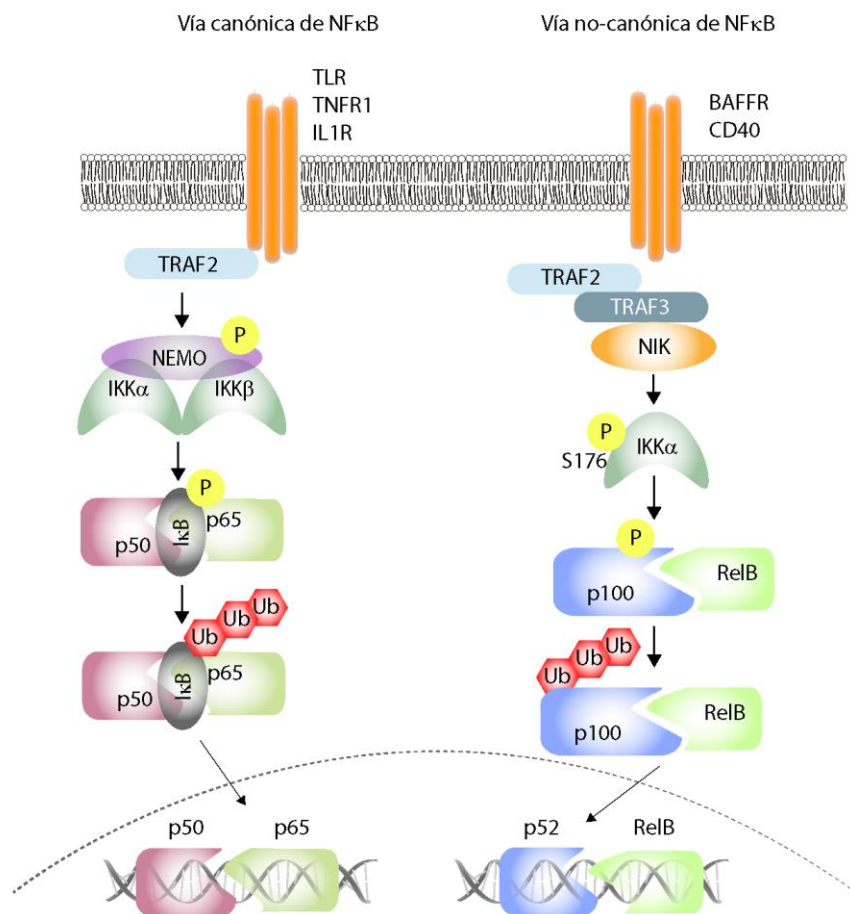


Ilustración 5. Esquema de las vías de señalización de NF κ B.

La ruta canónica de NF κ B se activa en respuesta a citoquinas proinflamatorias, al lipopolisacárido (LPS), factores de crecimiento y receptores de antígeno. Estos estímulos provocan la fosforilación del inhibidor I κ B tras lo que se degrada liberando al complejo p50/p65, que puede entonces translocarse al núcleo de la célula. La ruta no canónica de NF κ B se activa en respuesta a la señalización mediada por receptores como CD40, BAFFR, o el Receptor de Linfotoxina- β (LT β R). Esta ruta opera a través de la quinasa NIK, que activa a IKK α y éste media el procesamiento de p100 a p52, tras lo cual el complejo p52/RelB maduro se transloca al núcleo.

En linfocitos B, el DG y el Ca^{2+} liberado en respuesta a la señalización por PLC γ 2 a través del BCR activan a la proteína quinasa C β (PKC β). PKC β activa la vía canónica de NF κ B a través de un gran complejo molecular que incluye a las proteínas CARMA1, Bcl10, y MALT1. La regulación de NF κ B a través de este complejo es crucial para el correcto mantenimiento de la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células B, como se pone de manifiesto en el hecho de que alteraciones en estas proteínas han sido asociadas a la generación de distintos tipos de linfomas (Thome, 2004). Brevemente, PKC β fosforila a CARMA1 en la Serina 668, lo cual es esencial para su asociación con Bcl10 y MALT1, así como para la activación de las proteínas IKK. Otras fosforilaciones del complejo formado contribuyen a su vez a un bucle de retroalimentación positiva o negativa que regula la activación de IKK existiendo un ajuste muy preciso de esta vía en función de las necesidades de la célula (Shinohara et al., 2007). Por ejemplo, IKK β fosforila también a CARMA1 en el residuo S578, y eso estabiliza su interacción con Bcl10 y MALT1, pero la misma IKK β también fosforila a Bcl10, y esto induce su degradación y por tanto su disociación del complejo con MALT1. Por tanto, la secuencia temporal en la que suceden estas fosforilaciones da una idea de la importancia de la regulación fina del proceso.

- **Ruta de ERK**

Tras la activación del BCR, las células B activan a las proteínas de la familia Ras, que activan la vía de ERK. El factor de intercambio de nucleótidos (GEF) RasGRP3 es de especial importancia en el acoplamiento del BCR y la activación de Ras, a diferencia de otros tipos celulares, donde el principal GEF de Ras es Sos. PLC γ 2 podría estar participando en el reclutamiento de RasGRP3, ya que el dominio C1 de RasGRP3 se une al DG, uno de los productos derivados de la señalización de PLC γ 2. De hecho se ha demostrado que este dominio C1 es necesario para que RasGRP3 se localice en la membrana plasmática (Oh-hora et al., 2003). Además, se ha visto que la fosforilación en el residuo T133 de RasGRP3 es importante para la activación completa de RasGRP3, y esto es mediado precisamente por PKC β (Aiba et al., 2004). De esta forma, se ha propuesto un modelo en el que el DG generado por PLC γ 2 facilita el reclutamiento tanto de PKC β como de RasGRP3 a la membrana plasmática, y donde PKC β fosforila a RasGRP3 en la T133, lo que facilita su activación completa. Una vez activado, Ras unido a GTP se une directamente a Raf-1, la MAP3-quinasa de la vía de ERK. Raf-1 y B-Raf fosforilan y activan a MEK1/MEK2, que a su vez fosforilan finalmente a ERK1/ERK2. Las proteínas ERK fosforiladas forman dímeros y se translocan al núcleo donde pueden ejercer su función fosforilando y activando proteínas reguladoras de la transcripción como Fos y Jun (Kurosaki et al., 2010).

4.2. Señalización mediada por CD40

CD40 es un receptor que se encuentra en la membrana de las células presentadoras de antígeno, entre ellas los linfocitos B. Se trata de un miembro de la superfamilia de los receptores de factores de crecimiento tumoral (TNF) y es esencial para la respuesta inmune e inflamatoria, siendo especialmente crítico en la formación de centros germinales maduros, en el cambio de clase de las inmunoglobulinas, en la hipermutación somática, en la generación de células plasmáticas y células B de memoria (Elgueta et al., 2009).

El ligando de CD40 es CD154 (o CD40L), el cual se expresa en la membrana de los linfocitos T activados. El reconocimiento entre CD40 y CD40L da lugar a la agregación de varias moléculas CD40 que al activarse ponen en marcha una cascada de señalización. Cuando esto ocurre, se induce el reclutamiento de las proteínas de la familia TRAF (TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6) que interaccionan directamente con la cola citoplasmática de CD40 (Bishop, 2004). Existen tres sitios identificados en la región citosólica de CD40 de unión a estos adaptadores TRAF (Pullen et al., 1998). Las proteínas TRAF activan diferentes rutas de señalización, incluyendo la ruta canónica y no canónica de NF κ B, la de las MAPK (JNK y p38), PI3K, y la de PLC γ 2 (Bishop et al., 2007). No obstante, no todas las vías de señalización activadas por CD40 son mediadas por los adaptadores TRAF. Por ejemplo, recientemente se ha descrito que la quinasa Jak3 puede unirse directamente a CD40 induciendo a su vez la fosforilación del Transductor de Señales y Activador de la Transcripción 5 (STAT5).

Las rutas mejor caracterizadas de CD40 son, sin embargo, las mediadas a través de los interactores TRAF. Como se ha mencionado antes, ante la interacción CD40-CD40L, las proteínas TRAF son reclutadas directa o indirectamente al receptor y de esta forma las TRAF constituyen un elemento esencial en la señalización mediada por CD40.

TRAF1 y TRAF2 son reclutadas a CD40 y ambas son necesarias para la activación de la vía canónica de NF κ B. A su vez, TRAF2 estimula la proteína quinasa quinasa quinasa 1 (MEKK1), responsable de la activación de las rutas de Jnk y p38 (Gallagher et al., 2007). Sin embargo, la función principal de TRAF2 es precisamente la de reguladora negativa de la vía no-canónica de NF κ B. Se ha demostrado que TRAF2 y TRAF3 cooperan para degradar a la quinasa NIK de forma constitutiva en un proceso dependiente de Inhibidores celulares de la Apoptosis (cIAP) 1 y 2. Ante la interacción CD40-CD40L, el reclutamiento de TRAF2 detiene la degradación de NIK, favoreciendo su acumulación en el citoplasma y en consecuencia la sucesión de fosforilaciones que dará lugar a la activación de la vía no-canónica de NF κ B (Gardam et al., 2008). CD40 es también capaz de reclutar a la familia de adaptadores Cbl, caracterizadas por poseer propiedades E3-ubiquitina-ligasa. En células B las proteínas Cbl desempeñan un papel modulador

negativo de las vías NF κ B y Jnk. En concreto, Cbl-b se une a la región citosólica de CD40 junto con TRAF2, restringiendo la cantidad de TRAF2 que puede unirse a CD40 (Qiao et al., 2007). TRAF3 regula negativamente la vía NF κ B en células B, como demuestra el hecho de que células B deficientes en TRAF3 presentan un aumento en la fosforilación de Jnk y una acumulación de NIK (Zarnegar et al., 2008, Vallabhapurapu et al., 2008). Por otro lado, TRAF5 puede formar un dímero con TRAF3 que se une al dominio citosólico de CD40. Estudios con ARN de interferencia de TRAF2 o TRAF5 han demostrado que este dímero es esencial para la activación de la vía canónica y no canónica de NF κ B en células B (Hauer et al., 2005). TRAF 6 es reclutado a CD40 y junto con TRAF2 modula positivamente la señalización del receptor. Sin embargo, la formación del dímero TRAF6-TRAF2 no es dependiente de la unión a CD40, de forma que en ausencia del dominio de unión a TRAF6 de CD40, la estimulación del receptor aún es capaz de inducir el aumento de la expresión de CD80 y activación de Jnk en células B (Rowland et al., 2007). Por tanto, al menos parte de las funciones fisiológicas de TRAF6 se realizan a través de su interacción con TRAF2 y de forma independiente de la unión a CD40.

5. La superfamilia Ras

El trabajo de esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la función de RRas2 en la formación de los centros germinales. RRas2 es una GTPasa que está englobada en la superfamilia Ras, la cual a su vez está compuesta de más de 150 GTPasas pequeñas.

La superfamilia Ras está subdividida en cinco grandes familias en función de la secuencia de los miembros que las forman: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (Ilustración 6). Por su actividad GTPasa (de hidrólisis de GTP), todas estas proteínas ciclan entre su estado unido a GDP (estado inactivo) y unido a GTP (estado activo) y actúan como interruptores moleculares de diversos eventos moleculares dentro de la célula. Todas las familias comparten cierto grado de homología, sin embargo debido a las modificaciones postraduccionales, a las diferentes sublocalizaciones en la célula así como a los diversos mecanismos de regulación a los que cada miembro está sujeto, cada grupo está especializado en procesos celulares muy concretos. De esta forma, la familia Rho desempeña funciones relacionadas con la morfología y con la dinámica del citoesqueleto, Rab con el tráfico de membrana, Ran con el transporte nuclear, y Arf con el transporte vesicular. La familia Ras, en la que se va a centrar el trabajo de esta tesis está implicada en la proliferación celular.

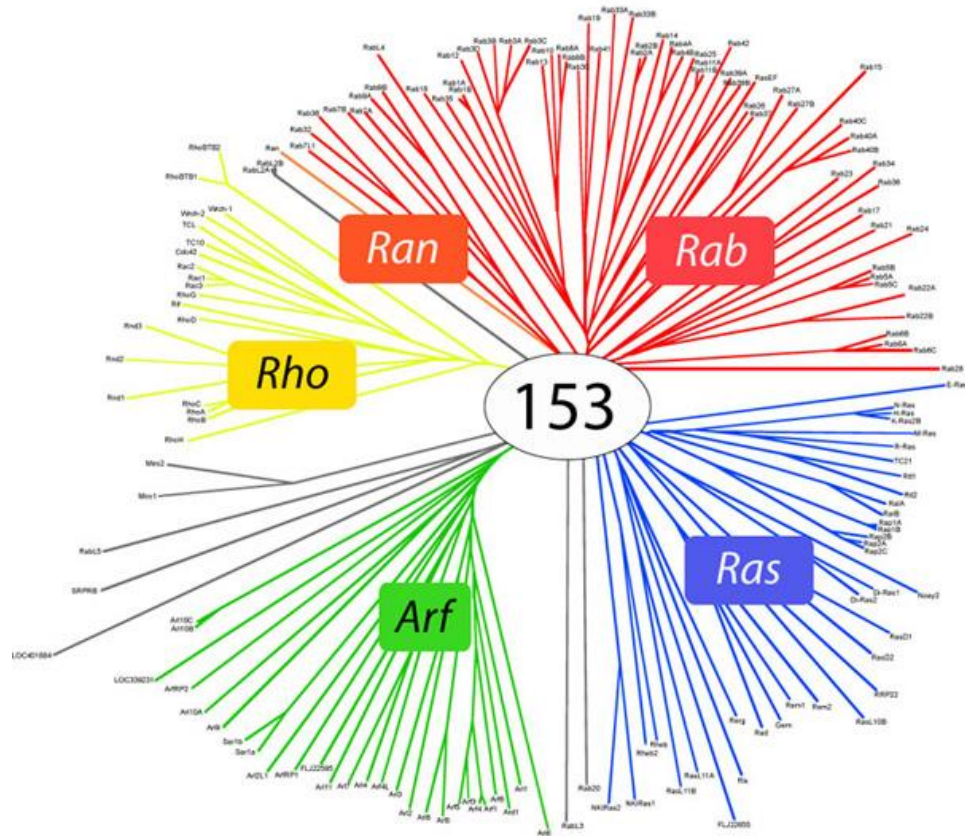


Ilustración 6. Esquema de la superfamilia Ras.

Se muestra en cada una de las ramas las 5 familias en las que se subdivide la superfamilia Ras: Ran, Rab, Ras, Arf, y Rho. Entre todas las familias hay más de 150 miembros de GTPasas. Adaptado de Wennerberg et al., 2005.

Estructuralmente, todos los miembros de la superfamilia Ras presentan una cola lipídica gracias a la cual se unen a la membrana plasmática. Desde esta localización, las GTPasas monoméricas pueden desarrollar interacciones lípido-proteína y proteína-proteína generalmente con receptores de membrana o con moléculas señalizadoras acopladas a éstos, de manera que ejercen un papel fundamental en la transducción de señales.

5.1. La familia Ras

La familia Ras se compone de 39 proteínas que comparten un alto grado de homología en la parte N-terminal, siendo especialmente evidente en el bucle de unión a fosfato (del inglés “P-loop”), y en las regiones de unión a proteínas efectoras “switch I” y “switch II”. En cuanto a la región C-terminal, todas contienen un dominio CAAX, responsable de su unión a la membrana. La expresión de los miembros de la familia Ras es ubicua, estando presente en todos los linajes celulares y órganos (Ilustración 7).

HRas	-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINN	
NRas	-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINN	
KRas	-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVFDEYDPTIEDSYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEYSAMRDQYMRGEGFLCVFAINN	classic
RRas2	-----MAAAGWRDGGGQEKYRLVVVGAGGVGKSALTIQFIQSYFVSDYDPTIEDSYTKQCVIDDRAALDILDITAGQEEFGAMREQYMRGEGFLVFSVTD	R-related
RRas	MSSGAASGTGRGRFRGGGPGGPPPSETHKLVVVGAGGVGKSALTIQFIQSYFVSDYDPTIEDSYTKICSDVGIPARLDILDITAGQEEFGAMREQYMRAGHGFLVFAIND	
RRas3	-----MATSAVPSDNLFTYKLVVVGAGGVGKSALTIQFFQKIFVSDYDPTIEDSYLKHTEDNQWAILDILDITAGQEEFSAMREQYMRGEGFLIVFSVTD	
		G1 switch I switch II
HRas	TKSFEDIHQYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDLP-ARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTR-QGVEDAFYTLVREIRQHKLRLKINF---PDESGEGCMSC---KCVLS	
NRas	SKSFADINLYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDLP-TRTVDTKQAHELAQSYGIPFIETSAKTR-QGVEDAFYTLVREIRQYRMKLN---SDDGTQGMGL---PCVVM	classic
KRas	TKSFEDIHQYREQIKRVKDSDDVPMVLVGNKCDLP-SRTVDTRQAQDLARSYGIPFIETSAKTR-QGVDDAFYTLVREIRHKEKMSKD---GKKKKKSKT---KCVIM	
RRas2	RGSFEIYKFRQRLRVKDRDEFPMLIGNKADLDHQRQVTEEGQQLARQLKVITYMEASAKIR-MNVDAQFHELVRVIRKFEQECPPSPPEPTRKEDKKGC---HCVIF	R-related
RRas	RGSFNEVGKLFQILRVKDRDDFPVVLVGNKADLESQRQVPRSEASAFGASHHVAYFEASAKLR-LNVDEAFQQLVRAVRKYQEQLFPSP-FSAPRKGGGC---FCVLL	
RRas3	KASFEHVDRFHQILRVKDRSEFPMILVANKVDLMLHLRKITREQQKEATKHNIPYIETSAKDPLNVDAFHLDLVRVIRQQIPEKSKKKKTKVRGDRATGTHKLQCVIL	
		G4 G5

Ilustración 7. Comparación entre las secuencias de los miembros de las subfamilias Ras clásica y R-Ras.

Se ha alineado la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas de la subfamilia Ras clásica humana con la de las tres proteínas de la subfamilia R-Ras. Los aminoácidos de RRas1 o RRas2 que difieren de la secuencia de los miembros de la familia clásica están resaltados en rojo. Los aminoácidos que no están conservados entre RRas2 y RRas1 o RRas3 están en azul. Las secuencias que corresponden a los bucles “switch I”, “switch II”. G1, G2, y G5 están subrayados.

Las GTPasas de la familia Ras se activan en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares regulando multitud de vías de señalización intracelulares, y permitiendo a la célula reaccionar a cambios en su microambiente. Los principales mecanismos moleculares implicados en la señalización de las Ras están relacionados con el crecimiento y división celular, la diferenciación y la supervivencia. Como consecuencia, mutaciones en genes *RAS* pueden conllevar la producción de proteínas Ras permanentemente activas (unidas de forma constitutiva a GTP) que señalizan incluso en ausencia de estímulos externos. Cabe resaltar que hiperactividad de Ras puede desencadenar procesos carcinogénicos. De hecho, los genes que codifican los miembros H-Ras, K-Ras, y N-Ras son los genes más frecuentemente mutados en el cáncer humano. Se ha encontrado que entre 20 y el 25% de todos los tumores humanos tienen alguna mutación activadora en alguna de estas tres proteínas, llegando incluso al 90% en ciertos tipos de cáncer como el de páncreas (Bos, 1989). Por tanto, el estudio de los miembros de la familia Ras, de su regulación y de las moléculas que ayuden a modular su actividad constituye uno de los campos más importantes en la búsqueda de tratamientos contra el cáncer.

Dentro de la familia Ras existen a su vez 6 subfamilias. Los miembros H-Ras, K-Ras y N-Ras comentados anteriormente conforman la subfamilia Ras propiamente dicha, también conocida como Ras clásica. Además de la subfamilia Ras clásica, existen las subfamilias R-Ras, Rap, Ral, Rheb y Rin (Bos, 1997, Reuther and Der, 2000, Wennerberg et al., 2005). Debido al papel atribuido a los miembros de la familia Ras clásica en el desarrollo del cáncer humano, esta familia ha sido ampliamente investigada en numerosos artículos en las últimas tres décadas. Sin embargo, el resto de subfamilias del grupo Ras han sido mucho menos estudiadas. La subfamilia R-Ras en

particular es la subfamilia más cercana en cuanto a homología de secuencia a la subfamilia de las Ras clásicas, y es la subfamilia a la que pertenece RRas2. A pesar de la alta similitud con las Ras clásicas, el papel de los miembros R-Ras como potenciales oncogenes está todavía por esclarecer.

5.2. La GTPasa RRas2

RRas2 pertenece a la subfamilia R-Ras que se compone de RRas1, RRas2 (o TC21) y RRas3 (o M-Ras) (Ehrhardt et al., 1999, Erdogan et al., 2007, Graham et al., 1999, Graham et al., 1996). En 1993 se descubrió la existencia de una GTPasa unida a la subunidad CD3 γ del TCR (Peter et al., 1993). Nuestro grupo demostró en el año 2009 que dicha GTPasa era RRas2, encontrándose unida a todas las subunidades del TCR en su forma inactiva a través de los ITAM (Delgado et al., 2009). En este trabajo no sólo se describe la unión directa de RRas2 con el TCR de las células T, sino que también se lo relaciona con el receptor de células B (BCR).

Comparado con el miembro H-Ras, de la familia Ras clásica, RRas2 tiene una capacidad intrínseca de intercambio de guanina muy elevada (Movilla et al., 1999). Además de esto, RRas2 es la única GTPasa que no forma parte de la subfamilia clásica que se ha encontrado mutada en tumores humanos (Barker and Crompton, 1998, Huang et al., 1995) y sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer (Arora et al., 2005, Clark et al., 1996, Sharma et al., 2005, Delgado et al., 2009).

A diferencia de los miembros de la familia Ras clásica, RRas2 activa de forma específica la subunidad catalítica p110 δ de PI3K (Murphy et al., 2002, Rodríguez-Viciano et al., 2004). PI3K es una gran familia de fosfatidilinositol-3-kinasas que a su vez se subdividen en cuatro grandes clases: clase I, II, III y IV. Las PI3K de clase I consisten de proteínas heterodiméricas conformadas por una subunidad reguladora y otra catalítica que en función de la similitud de sus secuencias se subdividen a su vez en las clases IA y IB. Las PI3K de tipo IA en concreto están formadas por la subunidad catalítica p110 y la subunidad reguladora p85. Existen asimismo diferentes variantes de cada una de estas subunidades de forma que en función de qué subunidad concreta forme parte del heterodímero, PI3K puede ejercer funciones específicas diferentes. En cuanto a la subunidad p110 en particular, las variantes son p110 α , p110 β , y p110 δ . Mientras que las dos primeras se expresan de forma ubicua en todos los tipos celulares, p110 δ se expresa mayoritariamente en leucocitos y de hecho se ha propuesto que ha evolucionado de forma paralela al sistema inmune adaptativo. En el trabajo de nuestro grupo donde se demostró la interacción de RRas2 con el TCR y el BCR, se describió también que en los linfocitos T y B RRas2 activa la subunidad p110 δ (Delgado et al., 2009). Con ello, se probó que RRas2 es esencial para la supervivencia de los linfocitos T y B maduros. Consecuentemente, los ratones deficientes en RRas2, a pesar de mostrar

un desarrollo aparentemente normal, manifiestan linfopenia derivada de un defecto en la proliferación homeostática y en la supervivencia de los linfocitos T y B. Una observación muy importante derivada de este trabajo fue que ratones deficientes en RRas2 inmunizados presentan una disminución significativa de centros germinales, tal y como muestran tanto las imágenes de microscopía de los ganglios linfáticos de estos animales, como los datos de citometría de flujo (Delgado et al., 2009).

En resumen, debido a que RRas2 se encuentra unido al TCR y BCR de forma constitutiva, nuestro grupo ha propuesto que RRas2 media una señalización tónica que asegura la homeostasis de las poblaciones T y B, manteniendo unos niveles adecuados de proliferación y supervivencia en condiciones basales. Sin embargo, quedaba por explorar el posible papel de RRas2 en otros contextos de la respuesta inmune, y más concretamente en poblaciones como la del centro germinal, así como la posible activación de otras rutas de señalización diferentes a la de PI3K en este escenario.

6. RRas2 y tumorigénesis

Como se ha dicho anteriormente, RRas2 es el único miembro de la familia R-Ras para el que se ha descrito una capacidad de transformar células *in vitro* y que se ha encontrada mutada o sobre-expresada en tumores humanos (Graham et al., 1999, Movilla et al., 1999, Chan et al., 1994).

En tumores humanos, se han encontrado mutaciones en RRas2 en sarcoma uterino, de ovario, y en tumores de mama (Barker and Crompton, 1998, Huang et al., 1995). RRas2 también se encuentra sobreexpresado en carcinomas de boca y de esófago (Arora et al., 2005, Sharma et al., 2005). Recientemente, Bustelo y colaboradores han demostrado un papel específico de RRas2 en el cáncer de mama, tanto en los primeros estadios como en la metástasis en el pulmón (Larive et al., 2014). Por otro lado también se han observado evidencias de la sobreexpresión de RRas2 en tumores del sistema nervioso (Gutierrez-Erlandsson et al., 2013). Sin embargo, al margen de estos estudios existen muy pocos artículos en la literatura científica que hayan abordado en profundidad el papel de RRas2 en tumores específicos. Puesto que nuestro grupo ha descrito el papel de RRas2 en la función homeostática de los linfocitos T y B, y dado que esta tesis se centra en el requerimiento de RRas2 para la reacción de los centros germinales, otro de nuestros objetivos ha sido explorar el papel de RRas2 en tumores linfoides.

6.1. Rutas de señalización implicadas en la tumorigénesis inducida por RRas2

Los efectores conocidos que son activados por RRas2 están compartidos con las Ras clásicas, incluyendo en este grupo a PI3K, Ral-GDS y Raf (Rosario et al., 2001). Debido a que a RRas2 se le han atribuido propiedades muy parecidas a las de las Ras clásicas, incluida su capacidad transformante, durante muchos años se ha debatido sobre si la señalización activada por RRas2 era solapante o incluso idéntica a la de Ras. RRas2 activado se une a Ral GDS, al igual que Ras (Marshall, 1996). Sin embargo, algunos estudios habían apuntado a que RRas2 y las Ras clásicas podrían utilizar rutas de señalización diferentes, y estar sujetas a una regulación distinta. En este sentido, se sabe que mientras que las Ras clásicas son susceptibles de ser farnesiladas, RRas2 puede encontrarse tanto farnesiladas como geraniladas, una modificación post-traducciona que la hace insensible a inhibidores de la farnesil-transferasa que han sido utilizados para bloquear el crecimiento de las células cancerosas que albergan mutaciones en Ras (Carboni et al., 1995). Incluso se ha propuesto que Ras y RRas2 podrían estar localizadas en diferentes compartimentos celulares (Lisanti et al., 1994). No obstante, Bustelo y colaboradores han descrito que las rutas activadas por RRas2 son en esencia las mismas que las activadas por Ras. RRas2 activa la ruta de MAPK a través de la interacción directa con Raf, y también activa la ruta de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), al igual que Ras (Movilla et al., 1999).

Se sabe que PI3K es requerido para desarrollar la capacidad tumorigénica de RRas2. PI3K activa a su vez a la serín-treonín quinasa Akt, lo que incrementa la proliferación, la supervivencia y la transformación celular a través de numerosos efectores entre los que se encuentran Bad, GSK-3 β y mTOR (Graham et al., 1999). También se ha propuesto que la transformación celular mediada por RRas2 puede iniciarse por una vía dependiente de PI3K pero que no requiere Akt (Erdogan et al., 2007).

Por otro lado, se sabe que H-Ras coopera en la inducción de la proliferación, la invasión y la metástasis a través de un mecanismo dependiente de Smad (Oft et al., 1998, Janda et al., 2002). Smad se encuentra por debajo de la ruta de señalización iniciada por el factor de crecimiento TGF β , que regula numerosos procesos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Bierie and Moses, 2006). Aunque en general TGF β desempeña un papel de inhibición del crecimiento normal y tumoral, en los casos en los que Ras se encuentra mutado el tratamiento con TGF β aumenta su capacidad tumorigénica. En el caso de RRas2, se sabe que éste actúa mediante un mecanismo independiente de Smad para inducir la proliferación celular, de forma que la sola expresión de RRas2 es suficiente para que las células pierdan su capacidad de responder a los efectos inhibitorios del crecimiento de TGF β (Erdogan et al., 2007).

No obstante, a día de hoy sigue existiendo cierta controversia en cuanto a los efectores y rutas activadas por RRas2, probablemente derivada de las distintas

aproximaciones experimentales y del uso de diferentes modelos celulares de estudio. Por tanto, queda por explorar los mecanismos moleculares por los que RRas2 puede inducir tumorigénesis en linfocitos T y B.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

7. Materiales

7.1. Líneas celulares

La línea celular Raji son células B derivadas de un linfoma de Burkitt humano (Pulvertaft, 1964). Las células Raji se cultivan en medio RPMI 5% de suero fetal bovino (FBS) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 100U/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomycin.

La línea celular HEK293T son células derivadas de células de riñón humano transformadas con adenovirus (Graham et al., 1977). Estas células contienen el antígeno grande de SV40 T, permitiendo la réplica episomal de los plásmidos que contienen el origen SV40 y la región temprana del promotor. Las células HEK293T se cultivan en medio DMEM 10% FBS suplementado con 2mM de L-Glutamina, 100U/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomycin.

Tabla 1. Materiales utilizados en cultivos celulares

PRODUCTO CULTIVOS	CASA COMERCIAL
RPMI 1640	Servicio de Cultivos del CBMSO
DMEM	Servicio de Cultivos del CBMSO
Placas y botellas de cultivos	BD-Falcon
FBS	Sigma
L-Glutamina	Servicio de Cultivos del CBMSO
Penicilina	Servicio de Cultivos del CBMSO
Estreptomycin	Servicio de Cultivos del CBMSO

7.2. Ratones

Durante el presente trabajo se han utilizado diferentes tipos de ratones transgénicos y no transgénicos. Los ratones no transgénicos son:

- Ratones de la cepa consanguínea C57BL/6 que expresa el alelo CD45.2 del locus "*Ptprc*", una proteína tirosina fosfatasa que se expresa en la membrana de todos los leucocitos.
- Ratones de la cepa consanguínea C57BL/6 Ly5.1 que tiene la variante alélica CD45.1 en el locus de "*Ptprc*", y que fue originalmente desarrollada por el Sloan

Kettering Institute al cruzar ratones C57BL/6 con ratones portadores de la variante alélica CD45.1.

Los ratones transgénicos que hemos usado en este trabajo han sido los ratones *RRAS1*^{-/-}, *RRAS2*^{-/-}, *HRAS*^{-/-}; *NRAS*^{-/-}.

***RRAS1*^{-/-}:** Los ratones *RRAS1*^{-/-} han sido generados por la compañía GenoWay. La construcción de “targeting” BAL1-HR que se ha empleado para la generación de este ratón transgénico contiene un cassette de resistencia a Neomicina flanqueado por secuencias FRT que se insertan en el intrón 1 y los sitios LoxP flanqueando los exones 2 y 6. Esta construcción se ha electroporado en células madre embrionarias de ratón de la cepa 129Sv/Pas, que posteriormente han sido seleccionadas con el antibiótico G418. Para genotipar los clones seleccionados, se procedió a un primer análisis por PCR de la recombinación homóloga del brazo 3'. Posteriormente, se verificó la recombinación homóloga tanto del brazo 3' y 5' por Southern blot. Tres clones independientes de un total de 48 fueron positivos para la recombinación de ambos brazos y se inyectaron en blastocistos de hembras C57BL/6. Uno de los clones dio lugar a 10 crías de las cuales 7 fueron identificadas como quimeras, incluyendo una quimera macho con un 99% de contribución. Se puso por tanto un cruce entre dicha quimera y una hembra C57BL/6 Flp, del cual nacieron 14 ratones con transmisión germinal que fue verificada mediante PCR dirigida a detectar la presencia del alelo modificado. Dos de las quimeras que presentaban una alta contribución (98% y 99% de quimerismo) se cruzaron con hembras C57BL/6J-Cre con el objeto de escindir la región flanqueada por las secuencias LoxP (exones 2-6) y generar por tanto un alelo “knock-out” constitutivo. Dos ratones de entre los 6 ratones agoutí nacidos de este cruce fueron positivos tanto para la presencia del alelo no escindiendo como del escindido, indicando que se trataba de ratones mosaico. Estos ratones se cruzaron con ratones C57BL/6, tras lo que se generaron 14 crías que fueron analizadas por PCR para detectar la presencia del alelo silvestre, el alelo escindido y el no escindido. Cuatro ratones fueron positivos para el alelo silvestre y el alelo escindido, indicando que albergaban el alelo knock-out en heterocigosis, lo que también fue confirmado mediante Southern blot. Una de las crías identificada como heterocigota para el alelo transgénico se cruzó con ratones C57BL/6J para generar la colonia *RRAS1*^{-/-} en el ‘Centro de Biología Molecular Severo Ochoa’.

***RRAS2*^{-/-}:** Los ratones *RRAS2*^{-/-} se generaron tal y como se ha descrito en Delgado et al., 2009.

***RRAS1*^{-/-}; *RRAS2*^{-/-}:** Los ratones dobles deficientes en los loci de *RRAS1* y *RRAS2* se ha generado mediante retrocruzamiento entre las líneas individuales *RRAS1*^{-/-} y *RRAS2*^{-/-}.

HRAS^{-/-};NRAS^{-/-}: Los ratones *HRAS^{-/-};NRAS^{-/-}* se generaron como se ha descrito en Vigorito et al., 2004

p53^{-/-}: Los ratones *p53^{-/-}* se generaron tal y como está descrito en Jacks et al., 1994

RRAS2^{-/-};p53^{-/-}: Los ratones *RRAS2^{-/-};p53^{-/-}* se han generado mediante el retrocruzamiento de las líneas individuales *RRAS2^{-/-}* y *p53^{-/-}*.

Eu-myc: Los ratones *Eu-myc* se han generado como se describe en Adams et al., 1985

RRAS2^{-/-};Eu-myc: Los ratones *RRAS2^{-/-};Eu-myc* se han generado mediante el retrocruzamiento de las líneas *RRAS2^{-/-}* y *p53^{-/-}*.

Para genotipar los ratones, se han usado los oligonucleótidos para cada uno de los alelos particulares a detectar, listados en la Tabla 2.

Todos los ratones se han mantenido bajo condiciones libres de gérmenes patógenos específicos (SPF) en el Servicio de Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de acuerdo con las directrices nacionales y europeas. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Ético del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM, Madrid).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados para genotipar los ratones.

ALELO	OLIGO 5'	OLIGO 3'
<i>RRAS2^{+/+}</i>	GGATCATGTTGTGGAGTTGTGGC	GTCCAAGAAGACATGGATGGGGG
<i>RRAS2^{-/-}</i>	GGATCATGTTGTGGAGTTGTGGC	AAACCCTCTTGCAAGTTCATCCG
<i>RRAS1^{+/+}</i>	CGCTCTAGCTGAGCCTCTGT	TACAGGGTCTTGTGGGGAAA
<i>RRAS1^{-/-}</i>	GGAGCAAGAGGAGGGAAGGAATGGG	CTCCAGAGGACTCAGTTCAATCC
<i>p53^{+/+}</i>	CGCCACAGCGTGGTGGTACCTTATGAG	GGATGGTGGTATACTCAGAGCCGGCCT
<i>p53^{-/-}</i>	CTA TCAGGACATAGCCTTGG	GGATGGTGGTATACTCAGAGCCGGCCT
<i>Ighmyc</i>	CAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG	CTGTGACTGGTGAGTACTCAACC

7.3. Reactivos y soluciones

Tabla 3. Reactivos, casa comercial y aplicaciones.

REACTIVO / PRODUCTO	CASA COMERCIAL	APLICACIÓN
Sales orgánicas, ácidos, bases y disolventes	MERCK, PANREAC, SIGMA	Varios
Separador celular /filtro de nylon (0,40 μm)	BD Pharmingen / Falcon	Obtención de células primarias
Filtros 0,45 μm	Millipore	Filtrado de sobrenadante viral
Placas p96 fondo v	Nunc	Tinción celular para citometría de flujo
Placas p100, p60, p6, p24, p96	Falcon	Cultivo celular
CountBright beads	Invitrogen /Life Technologies	Contaje celular por citometría de flujo
Membranas de nitrocelulosa 0,2 μm	Biorad	Western Blot
TEMED	Biorad	Western Blot
APS	Sigma	Western Blot
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	Western Blot
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen	Purificación de células de ratón con anticuerpos biotinilados
Heparina sódica	Chiesi	Extracción de sangre periférica de ratón
Polibreno	Sigma	Transducción lentiviral de células
jetPEI	PolyPlus Transfection	Transfección de células Hek293T
Sheep Red Blood Cells (SRBC)	Oxoid	Inmunización de ratones
NP-CGG ratio 20-29	Biosearch Technologies	Inmunización de ratones
NIP(15)-BSA	Biosearch Technologies	Marcaje para citometría de flujo
DAPI	Merck	Ciclo celular
Inhibidor de AKT VIII	Millipore	Estimulación celular / WB
Cell Trace Violet	Life Technologies	Proliferación / FC
BrdU	Sigma	Proliferación celular
Streptavidina-PerCP	BD-Pharmingen	Marcaje para citometría de flujo
Streptavidina-APC	BD-Pharmingen	Marcaje para citometría de flujo
Streptavidina-APC-Cy7	BD-Pharmingen	Marcaje para citometría de flujo
TransAM NF κ B Family kit	Active Motif	ELISA para ver proteínas en núcleo de la familia NF κ B
Clonotyping system-HRP	Southern Biotech	ELISA para determinación de isotipos de inmunoglobulinas

Optiman Cutting Temperature	Tissue Tek	Inclusión de tejidos en bloques de congelación aptos para el corte histológico con criotomo
Puromicina	Sigma	Selección celular
Higromicina	Roche	Selección celular

Tabla 4. Tampones y soluciones

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	Varias
TBS	50 mM TrisHCl, 276 mM NaCl, 54 mM KCl. pH 8	Western Blot
PBS-BSA 1%	PBS 1x, Azida 0,02%, BSA 1%.	Varias
TBS-TWEEN	TBS 1x, 0,1% tween	Western Blot
Tampón ACK	0,15 M NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA, pH 7,2-7,4	Lisis de eritrocitos
BRIJ96	20 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM IOAA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 0.33% Brij96, e inhibidores de fosfatasas y proteasas	Lisis celular para extracción de proteínas
Tampón de carga 1x	Glicerol 10%, βmercaptoetanol 5%, SDS 3%, azul de bromofenol, 1/8 v del tampón del gel concentrador	SDS-PAGE
Tampón del gel concentrador (gel de poliacrilamida)	0,4 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS	SDS-PAGE
Tampón del gel separador (gel de poliacrilamida)	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS	SDS-PAGE
Tampón de digestión de tejidos	100mM Tris-HCl pH 8,5, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA	Extracción de ADN genómico
Poliacrilamida	Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%	SDS-PAGE

7.4. Anticuerpos

Tabla 5. Anticuerpos

ANTICUERPO	CLON / CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	APLICACIÓN	ORIGEN	USO
Anti-Akt	9272	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:100
Anti-B220 (CD45R)-APC, - Biotin, FITC. – V450	RA3-6B2	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD4- Alexa647, -PerCP	RM4-5	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD8-APC, - PerCP	53-6.7	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD11c-APC, - Biotin	HL3	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD11b – Biotin, -PE	M1/70	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD16/32 Purified	2.4G2	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD19-PE	1D3	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200
Anti-CD19-PE-Cy7	1D3	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD21-PE	7G6	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD23-FITC	B3B4	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD38- Alexa488	90	Rat mAb	FC	Biolegend	1:200
Anti-CD40-PE-Cy5	4G10	Rat mAb	FC	Biolegend	1:200
Anti-CD40- Purified	HM40-3	Rat mAb	Estimulación	eBioscience	1:200
Anti-CD43- Biotinylated	S7	Rat mAb	Purificación	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD45.1-APC- Cy7	A20	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD45.2-APC	104	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD86-PE-Cy5	GL1	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200
Anti-CD95-FITC, - PE-Cy7	Jo2	Hamster Ab	FC	BD Bioscience	1:200
Anti-CD154 (ICOSL)-PE	MR1	Hamster Ab	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-CD275 (ICOSL)-Biotin	HK5.3	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200

Anti-CD278 (ICOS)-PE	7E.17G9	Rat mAb	FC	Biolegend	1:200
Anti-CD279 (PD1)-FITC	J43	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200
Anti-CXCR4-Biotin	2B11	Rat mAb	FC	eBioscience	1:50
Anti-CXCR5-Biotin	2G8	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-GL7 eFluor660	GL7	Rat mAb	FC	eBioscience	1:100
Anti-IgD-Biotin	11-26	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200
Anti-IgD-FITC, -V450	11-26c.2a	Rat mAb	FC	BD Horizon	1:200
Anti-IgG1-Biotin	A85-1	Rat mAb	FC	BD Bioscience	1:200
Anti-IgM-PE, -APC	II/41	Rat mAb	FC	eBioscience	1:200
Anti-Ras antibody	Ras10	Mouse mAb	WB	Thermo Scientific	
Anti-IgM F(ab') ₂	115-006-075	Goat pAb	Estimulación	Jackson Immunoresearch	
Anti-IKK α	Serum	Rabbit pAb	WB	Provided by S. Ley (MRC, London, UK)	1:1000
Anti-IL21R	4A9	Rat mAb	FC	BD Pharmingen	1:200
Anti-p100/p52	Serum	Rabbit pAb	WB	Provided by S. Ley (MRC, London, UK)	1:1000
Anti-pAkt (S473)	9271	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
Anti-pAkt (T308)	9275	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
Anti-pErk (T202/Y204)	9101	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
Anti-pIKK α/β S176/180	16A6	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
Anti-pIKK α T23	AP02417P U-N	Rabbit mAb	WB	Acris	1:1000
Anti-pS6 (S240/244)	D68F8	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
Anti-RelB	C1E4	Rabbit mAb	WB	Cell Signaling	1:1000
ANTICUERPOS SECUNDARIOS					
Anti-hámster FITC	127-095-160	Cabra, anti-hamster	FC	Jackson Immunoresearch	1:100
Anti-rabbit Alexa 488	A-21206	Rabbit mAb	FC		

7.5. Vectores

Tabla 6. Plásmidos

NOMBRE	PLÁSMIDO	ORIGEN	DESCRIPCIÓN
pMD2.G	pMD2.G	Addgene (Didier Trono)	Proteína de la envuelta VSV-G
psPAX2	psPAX2	Addgene (Didier Trono)	Proteína virales GAG y POL
pLKO.3-shTC21	pLKO.3 (Addgene)	Xosé Bustelo	ARN de interferencia de RRas2 (TC21)
pLVX-mTC21	pLVX (Clontech)		Secuencia de TC21 con una mutación puntual en el sitio de reconocimiento del ARN de interferencia de pLKO.3-shTC21

7.6. Oligos usados para RT-qPCR

ALELO	SECUENCIA OLIGO 5'	SECUENCIA OLIGO 3'
<i>BCL6</i>	GGAAGTTCATCAAGGCCAGT	GACCTCGGTAGGCCATGA
<i>BCL2</i>	GTACCTGAACCGGCATCTG	GGGGCCATATAGTTCCACAA
<i>BLIMP-1</i>	GGCTCCACTACCCTTATCCTG	TTTGGGTTGCTTCCGTTT
<i>IRF4</i>	GGAGTTTCCAGACCCTCAGA	CTGGCTAGCAGAGGTTCCAC
<i>RRAS1</i>	AAGGCAGATCTGGAGAACCA	TGCCTCATCGACATTGAGAC
<i>RRAS2 (TC21)</i>	CGTGATGAGTTTCCCATGATT	TAACTGCTGCCCTTCTCCT
<i>RRAS3 (MRAS)</i>	TGGGCCATCTGGGATGTT	CTGTGCGCATGTATTGTTCC
<i>HRAS</i>	CCTTCGAGGACATCCATCAG	CCATTGGCACATCATCTGAA
<i>KRAS</i>	TGTGGATGAGTATGACCCTACG	CCCTCATTGCACTGTACTCCT
<i>NRAS</i>	GAAGTGGCCAAGAGTTACGG	TGTAAAAGGCATCCTCCACA
<i>GAPDH</i>	CTCCCACTCTCCACCTTCG	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA

8. Métodos

8.1. Obtención y purificación de células T y B primarias de ratón

Para obtener células T y B primarias se extrajeron los ganglios linfáticos (inguinales, axilares y mesentéricos) y el bazo, respectivamente. El órgano entero se disgrega para conseguir una suspensión celular homogénea en PBS/FBS al 2%.

Tras la disgregación del tejido, las células se centrifugan durante 5 minutos a 1500 rpm, y se resuspenden de nuevo en PBS/FBS 2% filtrando los agregados con un filtro de 40 μm . En el caso del bazo, se realiza además una lisis de eritrocitos previa a la utilización de estas células con el tampón ACK detallado en la Tabla X, durante 2 minutos a temperatura ambiente tras lo que se para la reacción con PBS.

Tras el lavado de las células, éstas se resuspenden en medio de cultivo RPMI con FBS al 10%, o en el caso de ser experimentos de estimulación en RPMI sin FBS para dejar las células en depravación del estímulo del suero.

En los casos en que se necesita usar una población B o T pura, la suspensión celular obtenida se incuba con anticuerpos biotinilados que reconozcan los marcadores de las células que se quieren eliminar (selección negativa). En el caso de querer purificar la población B, se utiliza el anticuerpo anti-CD43, que reconoce la sialoforina, una proteína de membrana expresada por linfocitos T, granulocitos y monocitos pero no por linfocitos B. En el caso de la purificación de la población T, se utilizan los anticuerpos anti-B220, anti-NK1.1, anti-GR1, anti-CD11b y anti-CD11c, que reconocen marcadores expresados por linfocitos B, linfocitos NKT, granulocitos, y monocitos respectivamente. Posteriormente al marcaje con los anticuerpos primarios biotinilados, se procede a la incubación con las bolas magnéticas unidas a estreptavidina Dynabeads M-280 Streptavidin de Invitrogen en proporción célula: bola 1:1 durante 45 minutos en hielo, de forma que todas las células marcadas con los anticuerpos primarios se unirán a dichas bolas. Posteriormente, el tubo conteniendo la muestra se coloca en un imán y se recupera el sobrenadante (el proceso se repite 3 veces para asegurar que no quedan restos de células unidas a bolas magnéticas). De esta forma, todas las células marcadas con los anticuerpos primarios quedan eliminadas, (selección negativa).

8.2. Extracción de ADN genómico para el genotipado de los ratones

Para hacer el genotipado de los ratones, se extrae el ADN genómico a partir de un fragmento de cola cortado entre las 3 y 4 semanas de edad con una tijeras previamente desinfectadas. Esta muestra se somete a una digestión del tejido durante toda la noche a 55°C en presencia del tampón de digestión especificado en la Tabla 4 y con Proteinasa K (10 µg por muestra).

Una vez digerida la muestra, se procede a la obtención y purificación del ADN por extracción fenol-cloroformo. A la muestra digerida se le añade 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agita y centrifuga 10 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente; el ADN estará contenido en la fase acuosa. Dicha fase acuosa se lleva sobre 1 volumen fenol:cloroformo (24:1), que se agita y centrifuga 10 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente. Por último, la fase acuosa resultante se lleva sobre 2 volúmenes de etanol absoluto, lo que hace precipitar al ADN. El sedimento se recupera mediante una centrifugación de 10 min a 10000 rpm y temperatura ambiente. El ADN (precipitado blanco) se lava con 500 µl de etanol al 70% en agua, 10 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente. Se decanta y retiran los restos de etanol con pipeta, dejándose secar el sedimento al aire 10 min. El ADN se resuspende en agua destilada estéril hasta una concentración aproximada de 1 µg/µl. La concentración final se determinó a partir de la medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific). El ADN resultante se somete a la reacción de PCR indicada para caso dependiendo de la línea de ratones y los alelos que haga falta detectar.

8.3. Transducción de líneas celulares

Para la generación de líneas celulares que expresen establemente las construcciones indicadas, primero se producen las partículas virales en el sistema de Hek293T. Para ello, se transfectan las Hek293T con el sistema JetPEI. Este sistema, consistente en una polietilenamina lineal, recubre las partículas de ADN en complejos cargados positivamente que pueden interaccionar con los proteoglicanos aniónicos de la membrana celular. Una vez que se da esta interacción, los complejos se internalizan en la célula a través de vesículas endocíticas.

Las células Hek293T se transfectan transitoriamente con el vector que incluye la secuencia de interés (la lista de los plásmidos se encuentra en la Tabla 6), así como con los vectores que codifican para los genes virales que codifican para la envuelta *env* (pMD2.G) y las proteínas de empaquetamiento viral *gag* y *pol* (psPAX2). A partir de 24

horas tras la transfección, las células Hek293T comienzan a producir las partículas virales al sobrenadante de cultivo. El protocolo de transducción es el siguiente:

Día 1: Se plaquean las células empaquetadoras Hek293T en placas p6 a razón de 2×10^5 células por pocillo con 2 ml de medio DMEM 10% FBS, o bien 4×10^6 células en una p100 con 10 ml de medio.

Día 2: Se transfectan las células Hek293T con JetPEI y los 3 tipos de vectores necesarios, explicados anteriormente. Para ello se preparan las siguientes mezclas (cantidades referidas a un pocillo de p6):

MEZCLA A → 100 μ l NaCl 150 mM en PBS + 6 μ l JetPEI 225 μ M.

MEZCLA B → 100 μ l NaCl 150 mM en PBS + 0,5 μ g pMD2.G + 1 μ g psPAX2 + 1,5 μ g ADN de interés.

La mezcla A se añade sobre la mezcla B y se incuba entre 15 y 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación y después de cambiar el medio a las células empaquetadoras, se añade el volumen obtenido gota a gota. A las 48 horas tras la transfección de las Hek293T, se recoge el sobrenadante.

Día 3: En el caso de que las células diana se cultiven en un medio diferente al DMEM, y 24 horas tras la transfección, se cambia el medio de las Hek293T por el de las células en cuestión (RPMI para todas las líneas derivadas de linfocitos) para que las partículas virales se produzcan en el medio adecuado.

Día 4: Se recoge el sobrenadante de las 48 horas y se filtra (filtro 0,45 μ m) para eliminar posibles restos celulares de las Hek293T. A este sobrenadante se añade polibreno (8 mg/ml). El polibreno es un polímero catiónico que agrega las partículas virales aumentando la eficiencia de transducción viral.

Paralelamente, se cuentan las células diana y se resuspenden en el sobrenadante viral a razón de $3-5 \times 10^5$ células por punto de transducción (un pocillo de p6). La placa se centrifuga a 2200 rpm durante 90 min a 32°C. Tras esta centrifugación la placa se deja durante toda la noche a 37°C en el incubador.

Día 5: 24 horas tras la transducción se cambia el medio a las células transducidas, que se pueden analizar y/o utilizar desde 48 horas después de la transducción.

8.4. Citometría de flujo

Todas las tinciones para citometría de flujo se han realizado en placas p96 de fondo en v (Falcon), donde cada pocillo corresponde a un punto de tinción, correspondiente a una media de $0,5 \times 10^6$ células. Las incubaciones se han realizado siempre en hielo y con un tampón de tinción de PBS con 1% BSA y 0,02% azida sódica.

Las células se incubaron con anti-CD16/32 en el tampón de tinción previamente al marcaje con cantidades saturantes de los anticuerpos primarios acoplados a los respectivos fluorocromos listados en la Tabla 5 en un volumen final de 50 μ l y durante 20 minutos. Tras esta primera incubación, se hace un lavado con PBS-BSA 1% y en el caso de que la tinción contenga algún anticuerpo primario que no esté marcado directamente con un fluorocromo se procede al marcaje con un anticuerpo secundario o con una estreptavidina marcada (anticuerpos biotinilados) detallada también en la Tabla 5.

Para realizar las tinciones intracelulares, las células se estimularon durante los tiempos indicados y dicha estimulación se detuvo con paraformaldehído a una concentración final del 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se marcaron con los anticuerpos extracelulares tal y como se ha descrito más arriba, tras lo que se permeabilizan con metanol durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se hace un lavado con PBS-BSA 1% y se procede a realizar el marcaje intracelular durante toda la noche con los fosfo-anticuerpos específicos. Todos los ensayos de citometría de flujo se han analizado en un citómetro de flujo FACSCalibur o FACSCanto II (Becton-Dickinson), con el software CellQuest o FACSDiva respectivamente, y en ambos casos los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo (TreeStar). En los casos indicados, se realizó también el conteo de las células por citometría con las bolas de conteo CountBright™ beads (Invitrogen).

8.5. Análisis de ciclo celular

Para analizar el ciclo celular en las células B de centro germinal, primero se realiza la tinción extracelular de citometría de flujo como está descrito en Métodos 2.2. Posteriormente se fijan las células con metanol-FBS 30% frío durante 30 minutos a toda la noche (O/N). La presencia de suero fetal bovino ayuda a preservar los fluorocromos de la tinción extracelular en los pasos subsiguientes de fijación y permeabilización necesarios para la tinción intracelular del ADN. Posteriormente, se hace la tinción nuclear incubando con DAPI (1 μ g/ml, Sigma D9542) durante 5 minutos y se analiza por citometría de flujo.

8.6. Análisis de proliferación celular

La proliferación celular *in vivo* en respuesta a la inmunización con SRBC se analizó en ensayos de transferencia adoptiva con ratones receptores Ly5.1 a día 7 post-inoculación y 5 horas tras la inyección intraperitoneal de BrdU (2,5 mg por ratón, Sigma B5002). De forma alternativa, también se analizó la proliferación *in vivo* con células procedentes de ratones o bien silvestres o *RRAS2^{-/-}* y marcadas con Cell Trace Violet (CTV™ Life Technologies) inoculadas por vía intravenosa en ratones receptores CD45.1. En este caso, la proliferación celular se analizó por citometría de flujo a los 7 días p.i con SRBC.

La proliferación *in vitro* de células B purificadas se realizó en medio de cultivo RPMI 1640 (10% FBS suplementado con 20 μ M 2-mercaptoetanol y 10 mM piruvato sódico) y fue analizado mediante la incorporación de timidina tritiada (³H-timidina) 48 horas tras la estimulación con IL4 (5 ng/ml) y anti-IgM o anti-CD40 a la concentración indicada.

8.7. Inmunizaciones y generación de centros germinales

Para los experimentos para inducir la reacción de centro germinal (CG), se han inmunizado ratones de entre 6 y 12 semanas de edad mediante la inyección intraperitoneal (i.p) con 2×10^9 eritrocitos de cordero (SRBC) o con el conjugado NP-CGG (hapteno 4-Hidroxí-3-nitrofenilacetilo acoplado a la proteína gamma-globulina de pollo, ratio 20-29) en un volumen final de 200 μ l tal y como está descrito en Aiba et al., 2010.

En el caso de los eritrocitos de cordero, se cuentan las células haciendo las diluciones necesarias para ello (generalmente 1: 10^4). Se realizan los cálculos necesarios para tomar 2×10^9 eritrocitos por ratón que ha de ser inmunizado y con el volumen necesario se realizan los lavados con PBS 1X hasta que el sobrenadante queda completamente transparente. Para ello, se centrifugan los eritrocitos a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C y sin freno.

En el caso de querer analizar la reacción de los centros germinales, los ganglios linfáticos y/o bazo de los ratones inmunizados se extrajeron a los 7 días post-inoculación (p.i), excepto en los experimentos donde está especificado. Para los experimentos de inmunohistoquímica, dichos órganos se fijaron con PFA 4% e incluyeron en OCT tal y como está descrito en la página 84. A partir de estos órganos se procedió a su procesamiento para ser analizados por citometría de flujo, siguiendo el protocolo previamente descrito. Las inmunoglobulinas solubles se cuantificaron por

ELISA para la determinación de los diferentes isotipos (Southern Biotech) con una dilución 1:100 a partir del suero obtenido de sangre periférica de los ratones inmunizados.

8.8. Análisis de expresión génica por RT-qPCR

Para analizar los niveles de ARN mensajero de un gen en particular, primero se extrajo el ARN total de células B o T purificadas (tal y como está explicado en el apartado Métodos 2.1) usando el kit RNAeasy según las instrucciones del fabricante (QIAGEN 74134). A continuación, el ARN obtenido se usó para llevar a cabo la reacción de transcriptasa inversa siguiendo el siguiente protocolo:

Reacción de retrotranscripción

Para hacer la reacción de transcripción inversa del ARN, se utilizaron 100 ng de ARN total en un volumen total de 20 μ l. Se empleó el kit de retrotranscripción de Life Technologies usando hexámeros aleatorios, y la transcriptasa inversa SuperScriptIII; y el cDNA obtenido se utilizó para hacer la reacción de qPCR.

Reacción de qPCR

El cDNA obtenido de la retrotranscripción se amplificó con los oligonucleótidos específicos de cada gen presentados en la Tabla 1.6 usando el mix de PCR SYBR Green (Promega). Todos los oligonucleótidos han sido diseñados para saltar al menos un intrón. El volumen final de la reacción ha sido de 10 μ l conteniendo 0,1 μ l de cDNA de la muestra de interés (excepto en la reacción control donde no se añade cDNA), 3,9 μ l de agua (4 μ l en la reacción control), 1 μ l de la mezcla de los oligonucleótidos 5' y 3' a 5 μ M y 5 μ l de GoTaq qPCR Master Mix. El protocolo de amplificación fue el siguiente:

2'/95°C + 40 x (3''/95°C + 30''/60°C) + (15''/95°C + 15''/60°C + 15''/95°C)

La adquisición de fluorescencia se hizo durante la amplificación y a lo largo de toda la rampa de temperatura en el ciclo de disociación o melting. Se utilizaron triplicados técnicos para corregir errores de pipeteo en la carga de la placa y también triplicados biológicos para obtener estadísticas significativas. Además se introdujeron controles sin cDNA para descartar contaminaciones y un control de la reacción de retrotranscripción donde se añade la muestra de ARN sin retrotranscriptasa para descartar la amplificación inespecífica a partir del ADN genómico.

En todos los casos, los datos se normalizaron en función del gen de expresión constitutiva *GAPDH*.

En los casos en los que los datos se muestran con cantidades absolutas, la expresión se corrigió usando un plásmido (GeneArt) conteniendo secuencias de 6 fragmentos amplificados con los oligos utilizados para la RT-qPCR. El plásmido se lineariza con la enzima de restricción *Ascl* antes de la amplificación y se cuantifica con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Esto permite medir el número de copias de cada ARN mensajero por ng de ARN total y finalmente, todos los valores se refieren a los del gen *RRAS1*.

La reacción de qPCR fue realizada en un equipo de ABI PRISM 7900HT Fast (Applied Biosystems). Los resultados de expresión génica fueron analizados con el software SDS2.4.

8.9. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

La inmunohistoquímica de las secciones obtenidas de los tejidos incluidos en OCT se realizó como está descrito en Cubelos et al., 2008.

8.10. Análisis de expresión génica por microarray

Los ensayos de expresión génica con microarrays se realizaron con células B de CG purificadas de bazo de 4 - 6 ratones inmunizados con SRBC por citometría de flujo con un citómetro FACS Vantage (Becton-Dickinson). El ARN de las células purificadas se extrajo con un kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN 74134). La integridad del ARN se estudió con un bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Los protocolos de marcaje e hibridación se realizaron de acuerdo a las indicaciones de Affymetrix. Brevemente, se amplificaron 100 ng de ARN total y se marcaron usando el kit WT Plus Reagent kit (Affymetrix). Posteriormente, se hibridaron en el panel Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Los lavados y escaneados se hicieron utilizando el sistema *GeneChip* de Affymetrix (GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 7G).

8.11. Sondas mitocondriales (MitoTracker®)

La masa y el potencial mitocondrial se ha medido con las sondas MitoTracker® Green y MitoTracker® Red respectivamente (Invitrogen). Las células primarias vírgenes o estimuladas in vitro con anti-IgM o anti-CD40 se incubaron durante 30-45 minutos a 37°C con ambas sondas simultáneamente (100 nM) en medio RPMI, ya que las sondas

difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática. Después, las células se lavan y se incuban con los anticuerpos extracelulares para su posterior análisis por citometría de flujo.

8.12. Medida del consumo celular de oxígeno

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) así como la tasa de acidificación extracelular (ECAR) se ha medido con un analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). El día previo al análisis se han sembrado 2×10^6 de células B por pocillo en presencia de medio RPMI y anticuerpo anti-IgM Fab2 (10 µg/ml) en los casos correspondientes. Se han medido 5 pocillos por cada tipo de tratamiento en cada experimento independiente. El día del análisis, las células se pre-incuban con medio DMEM suplementado con glucosa (25 mM), piruvato (1mM), y glutamina (2 mM) durante una hora a 37°C en un incubador libre de CO₂. Las medidas de OCR fueron programadas con inyecciones sucesivas de DMEM, oligomicina (5µg/ml) carbonil-cianida 4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 300nM), y rotenona (1µM) con antimicina A (1µM). Los cálculos se han realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.13. Curvas de supervivencia

Para los ensayos de monitorización de formación de tumores *in vivo*, se han mantenido los ratones en condiciones SPF y dieta normal. Al menos una vez a la semana se observa el comportamiento de los ratones, se palpan, y se buscan posibles masas tumorales. Si la media del diámetro del tumor excede 20 mm (aproximadamente), tiene ulceración del tumor, o éste interfiere con el movimiento y funcionamiento de los órganos vitales; si presenta problemas para moverse y/o parálisis, se procede a la eutanasia del animal de acuerdo con las indicaciones y criterios de punto final.

8.14. Estudios anatomopatológicos

En el caso de los estudios de monitorización de aparición de tumores en ratones, y de forma sistemática se aislaron y fijaron los distintos órganos internos afectados de aquellos animales que presentaron síntomas de enfermedad o alteración fisiopatológica durante la necropsia y siguiendo los criterios de punto final. Para ello, hemos usado el método de inclusión en Optiman Cutting Temperature (OCT, Tissue-Tek), en moldes adecuados al tamaño del tejido, y fueron inmediatamente depositados sobre hielo seco o nitrógeno líquido para la congelación ultra-rápida del tejido a conservar.

8.15. ELISA de NFκB

Las células B purificadas de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} se estimularon con anti-IgM o anti-CD40 durante los tiempos indicados y las cantidades de cada factor de transcripción NFκB en el núcleo se midieron mediante el aislamiento de fracciones nucleares con el kit TransAM® NFκB Family (Active Motif) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.16. Western Blot y activación de células B

Las células B purificadas del bazo (1×10^6 por tiempo de estimulación) fueron estimuladas durante diferentes tiempos con anti-IgM o anti-CD40 a 37°C. Tras el periodo de incubación, las células se lisaron con el buffer de lisis Brij96, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (0.33% Brij96, 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.8], 10 mM yodoacetamida, 1 mM PMSF, 1mg/ml leupeptina, 1mg/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato de sodio y 20 mM de fluoruro de sodio). El SDS-PAGE y el inmunoblot se realizó como se ha descrito en Martinez-Martin et al., 2011, y las membranas fueron incubadas con los anticuerpos listados en la Tabla 5. La cuantificación de las películas autoradiográficas se hizo utilizando el software de Fiji.

8.17. Estudios estadísticos

Los datos cuantitativos que se muestran han sido analizados con el test estadístico de dos colas Mann-Whitney y los datos están representados con su respectiva media y el error estándar medio (SEM). El software utilizado para todos estos análisis es el GraphPad Prism. Cada valor representa la media de al menos tres conjuntos de datos. *P < 0.05 y **P < 0.005 (test de Mann-Whitney de dos colas).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización del papel de RRas2, una GTPasa pequeña que interacciona con el BCR (Delgado et al., 2009), en la formación y funcionalidad de los centros germinales. Así mismo, se pretende estudiar el mecanismo molecular a través del cual RRas2 ejerce este papel, así como su incidencia en la formación tumoral de los linfomas derivados de centro germinal. En base a este objetivo principal se pueden enumerar los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la posible redundancia entre RRas2 y otras GTPasas de la familia Ras en la formación de centros germinales y funcionalidad de los linfocitos B.
2. Caracterizar el defecto en la formación de centros germinales *in vivo* en ratones deficientes en RRas2.
3. Describir el mecanismo molecular por el cual RRas2 participa en la formación y funcionalidad de los centros germinales.
4. Caracterizar los efectos de la eliminación de RRas2 durante la generación de linfomas en modelos de ratón.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. RRas2 desempeña un papel esencial, no redundante, e intrínseco de las células B en la formación de centros germinales.

RRas2 es una GTPasa pequeña que forma parte de la subfamilia “Ras-related”, o R-Ras, la cual comparte un alto grado de homología de secuencia con la subfamilia Ras clásica (Ilustración 7). A pesar de esta relación a nivel de secuencia con las Ras clásicas, sobre las cuales hay ya cuantiosa literatura científica, la subfamilia R-Ras ha sido mucho menos investigada. Concretamente, existen muy pocos trabajos que aborden el papel de RRas2 y su función en las poblaciones linfoides ha sido poco estudiada. El trabajo realizado por Delgado, P. y colaboradores (Delgado et al., 2009) describió por primera vez una relación directa de RRas2 con los receptores de células T y B (TCR y BCR respectivamente). En dicho trabajo se demostró mediante ensayos de inmunoprecipitación que, en condiciones basales, RRas2 se encuentra asociado a IgM e IgD de membrana, estableciendo así una interacción constitutiva con el BCR (y por tanto independientemente del estado de activación del linfocito). En dicho trabajo también se describió que la ausencia de RRas2 provoca una disminución en el número de linfocitos B y de su proliferación homeostática.

1.1. El papel de RRas2 en las células B es específico y no redundante

Dada la homología de secuencia entre RRas2 y el resto de miembros de las subfamilias R-Ras y Ras clásicas, nuestra primera aproximación fue averiguar si RRas2 cumplía funciones específicas o si había alguna redundancia con otros miembros de estas subfamilias. La homología en la secuencia es particularmente evidente en las regiones que codifican los bucles de unión a nucleótidos (G1-G5) y aún más especialmente en los bucles “switch I” y “switch II”, los cuales son prácticamente indistinguibles entre los diferentes miembros (Ilustración 7). Esta identidad de secuencia podría sugerir una redundancia funcional entre los 6 miembros comprendidos entre las dos subfamilias. Los datos de expresión de ARN mensajero muestran que la transcripción del gen *RRAS2* era más alta en aquellas poblaciones linfoides para las que se ha descrito una función de RRas2; esto es, células B marginales, foliculares, y de centro germinal. No obstante, estas poblaciones también expresan en distintos niveles otras GTPasas de la familia R-Ras y clásica (Figura 1 A y B). Por tanto, nos preguntamos si la función que habíamos descrito previamente para RRas2 en la homeostasis de las células B era específico de esta GTPasa o si por el contrario podría también ser realizado por otros miembros de las subfamilias R-Ras o la Ras clásica.

Para abordar esta cuestión, y por tratarse del miembro más cercano a RRas2, en primer lugar estudiamos el papel de RRas1 en la función linfoide. Para ello, generamos un modelo de ratón deficiente en RRas1 (ratón *RRAS1*^{-/-}) en el que se ha eliminado la región comprendida entre los exones 2 y 6, que codifica la mayor parte de la proteína. En este ratón la expresión de RRas1 es, tal y como esperábamos, indetectable tanto por PCR cuantitativa (Figura 2A) como por Western Blot (Figura 2B).

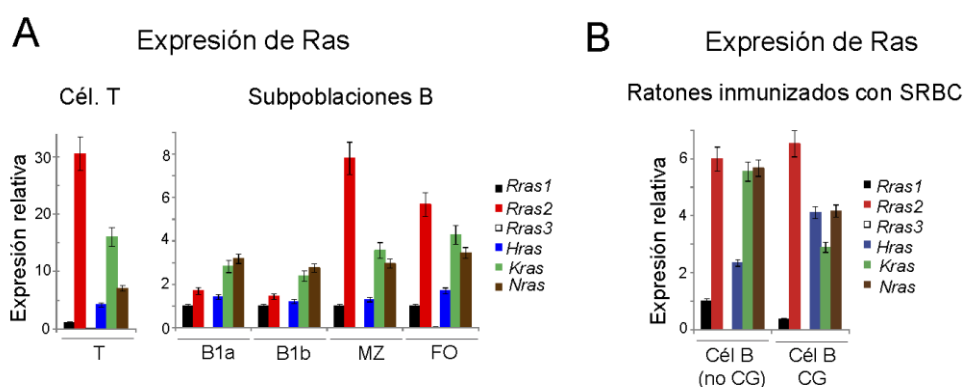


Figura 1. Expresión de ARN mensajero de los diferentes miembros Ras.

(A) Expresión del ARN mensajero de los tres genes que codifican para los tres miembros de la familia Ras clásica (H-, K-, y N-Ras) y los tres miembros de R-Ras (RRas1, RRas2 y RRas3) determinado por RT-qPCR en células T y en las diferentes subpoblaciones B purificadas de ratones WT. Los datos que se muestran son medias con sus respectivas desviaciones estándar de triplicados tras normalizar con respecto a la cantidad de RRas1: *P < 0.05; **P < 0.005 (T-test de Student bilateral).

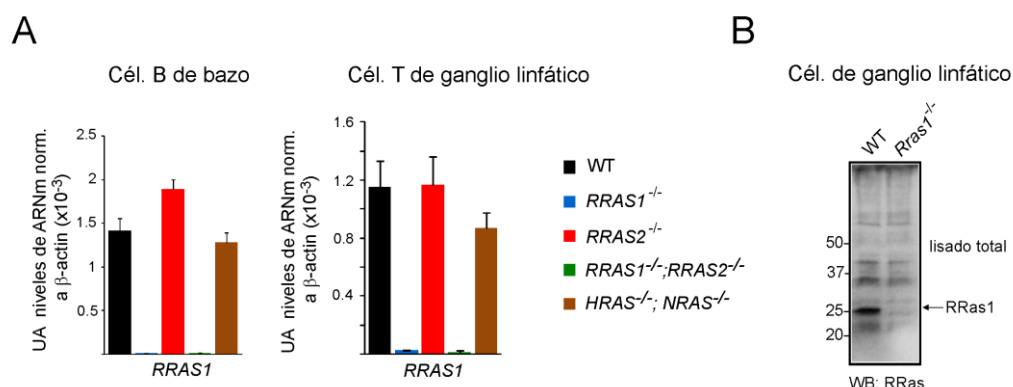


Figura 2. Expresión de RRas1 en ratones *RRAS1*^{-/-}

(A) La expresión de ARN mensajero de *RRAS1* se determinó por PCR cuantitativa (RT-qPCR) en células de bazo y células de ganglio linfático totales procedentes de ratones WT, *RRAS1*^{-/-}, *RRAS2*^{-/-}, *RRAS1*^{-/-}; *RRAS2*^{-/-}, y *HRAS*^{-/-}; *NRAS*^{-/-}. (B) Análisis de la expresión de la proteína RRas1 en lisados de proteína total de células de ganglio linfático aislados de ratones WT y *RRAS1*^{-/-}. El inmunoblot ha sido realizado con el anticuerpo monoclonal Ras10. La banda correspondiente a la proteína RRas1 está indicada con una flecha y la posición de los marcadores de peso molecular que se corrieron en paralelo está indicado a la izquierda.

Tras comprobar que el ratón *RRAS1*^{-/-} no expresaba *RRas1*, nuestro siguiente paso fue analizar las poblaciones B y T en dicho modelo animal. Encontramos que el número total de linfocitos T (tanto los procedentes del bazo como de los ganglios linfáticos) presentaba una reducción de entre 30-40% con respecto al de los animales silvestres (WT) homólogos de la misma línea. Esta reducción se dio en las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ del bazo, y en las CD8⁺ en ganglios linfáticos (Figura 3A-C). Por el contrario, el número de células B no presentaba ninguna alteración en ninguno de los tejidos analizados, a diferencia de lo encontrado en nuestros ratones *RRAS2*^{-/-} (Delgado et al., 2009). En cuanto a *RRas3*, el tercer miembro de la subfamilia R-Ras, éste no se expresa en ninguna población linfoide (Figura 1). Por tanto, podemos concluir que *RRas2* es la única GTPasa de la subfamilia R-Ras que desempeña un papel específico y no redundante en la homeostasis de las células B.

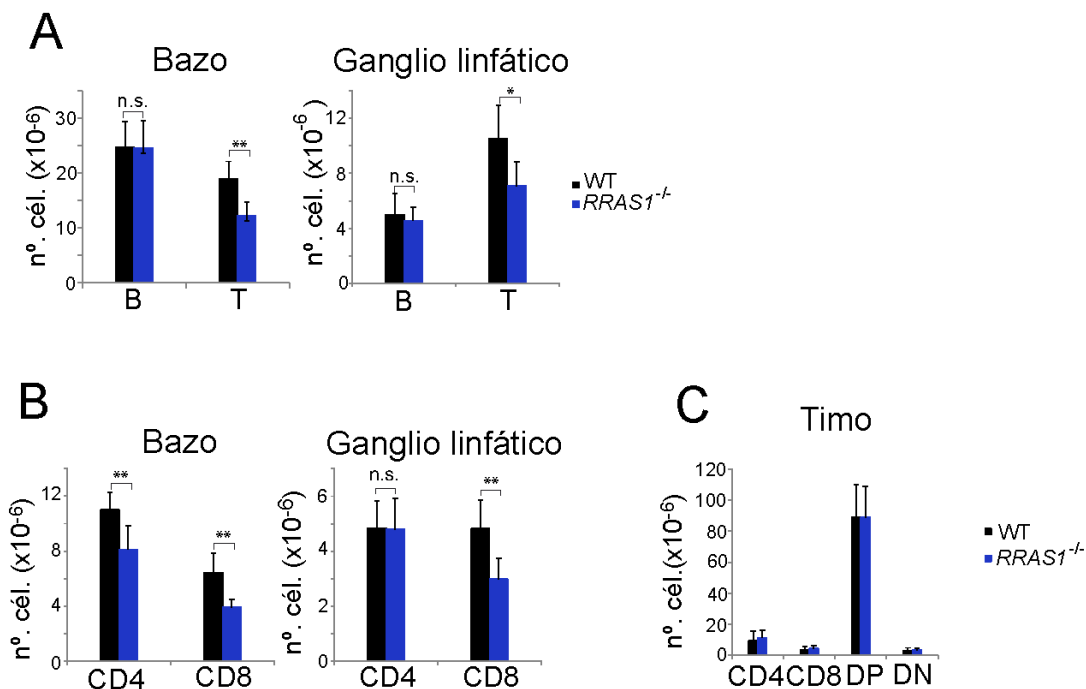


Figura 3. *RRas2* tiene un papel no redundante con *RRas1* en el mantenimiento de las poblaciones B.

(A) Número total de células B y T procedentes del bazo y de una selección de ganglios linfáticos de ratones WT y *RRAS1*^{-/-} (n= 10).

(B) Número total de células T CD4⁺ y CD8⁺ analizadas igual que en (A).

(C) Número total de las poblaciones mayoritarias del timo en ratones WT y *RRAS1*^{-/-} de 6 semanas de edad (n=10).

Además, con el objetivo de comprobar si *RRas2* podría estar supliendo alguna función de *RRas1* en ausencia del último, estudiamos también las poblaciones B y T en

ratones dobles deficientes en *RRas1* y *RRas2* (*RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-}). Los resultados muestran que estos ratones presentan un fenotipo muy similar a los ratones *RRAS2*^{-/-}, lo que refuerza la conclusión anterior e indica que cada GTPasa de la subfamilia R-Ras ejerce un papel independiente en el control de cada una de las poblaciones linfoides (Figura 4).

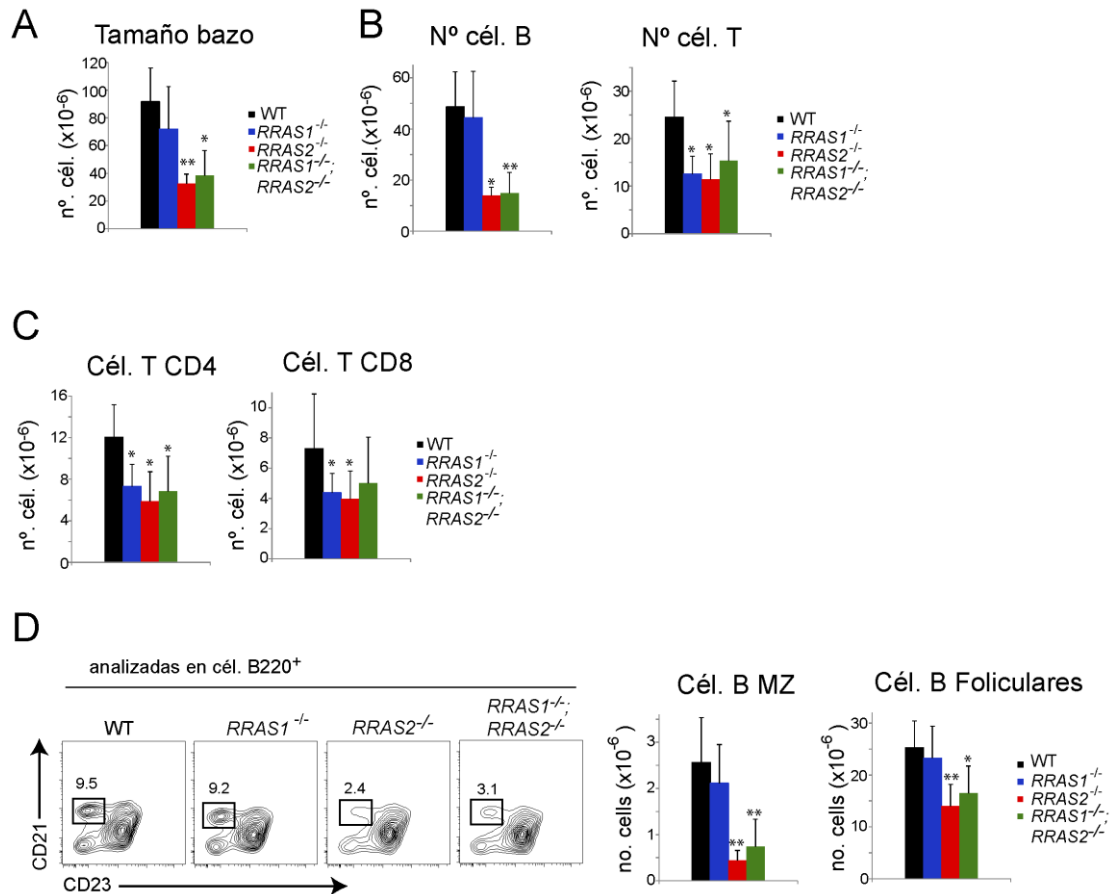


Figura 4. *RRas2* ejerce un papel específico en el mantenimiento de las células B.

(A) Tamaño del bazo de ratones WT, *RRAS1*^{-/-}, *RRAS2*^{-/-}, *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} analizado a través del conteo de células linfoides totales (n=6).

(B) Número total de células B y T procedentes de bazo de ratones de los genotipos indicados (n=6).

(C) Número total de células T CD4⁺ y CD8⁺ analizadas como en (B).

(D) Diagramas de citometría de flujo que muestran la expresión de los marcadores CD21 y CD23 analizado en células B B220⁺ de ratones con los genotipos indicados. Los recuadros indican el porcentaje de células B con un fenotipo de Zona Marginal (MZ, CD21^{high} CD23^{low}). La población CD21^{low} CD23^{high} corresponde a las células B foliculares. A la derecha se muestran las cuantificaciones de ambas poblaciones de cada uno de los genotipos (n=8).

1.2. La deficiencia en RRas2 produce un defecto en la formación de centros germinales

Los ratones *RRAS2*^{-/-} desarrollan una respuesta humoral subóptima cuando se someten a una inmunización con antígenos dependientes de células T (Delgado et al., 2009), posiblemente debido a un defecto en la reacción de los centros germinales (CG). Nuestra siguiente pregunta por tanto fue si estos defectos eran específicos de la GTPasa RRas2 o si por el contrario se observaban fenotipos similares causados por la deficiencia en cualquier otro miembro de las subfamilias R-Ras o Ras clásica. Para ello, estudiamos la formación de centros germinales en ratones *RRAS1*^{-/-} y *RRAS2*^{-/-}, y también en los ratones dobles deficientes *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-}. Los ratones *KRAS*^{-/-} son letales embrionarios (Johnson et al., 1997) y por tanto no hemos podido estudiarlos en este trabajo, pero sí hemos incluido ratones dobles deficientes en dos de las tres Ras clásicas (*HRAS*^{-/-};*NRAS*^{-/-}), que se expresan en células B maduras (Figura 5). En concreto, indujimos la reacción de centro germinal inoculando estos animales con eritrocitos de cordero (SRBC), lo que induce una potente respuesta inmune. 7 días después de esta inoculación, analizamos la presencia de células B de CG en los bazo de dichos animales por citometría de flujo con los marcadores específicos de superficie GL7 y CD95. Tal y como esperábamos, detectamos una reducción de 2,5 veces en el número de células B de CG en ratones deficientes en RRas2. Además, esta reducción era específica de RRas2 puesto que los ratones *RRAS1*^{-/-} y *HRAS*^{-/-};*NRAS*^{-/-} presentaban niveles normales de CG (Figura 5A). Además, el fenotipo de CG de los ratones doble mutantes *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} era muy similar al de los ratones *RRAS2*^{-/-} (Figura 5A). También analizamos la presencia de células B de CG en las placas de Peyer, ya que estos órganos linfoides situados a lo largo del tracto intestinal contienen multitud de centros germinales sin necesidad de inmunización exógena, probablemente debido a la continua exposición a antígenos intestinales (Lycke and Bemark, 2012). Nuestros resultados mostraron que había una reducción significativa de células B de CG en los ratones deficientes en RRas2 y en los doble mutantes *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} en comparación con los ratones WT o con los deficientes en RRas1 (Figura 5B). Esto nos indica que RRas2 desempeña un papel no redundante y esencial en la formación de las células B de CG. Por otro lado, quisimos descartar la posibilidad de que este defecto en la generación de CG fuera secundario a un defecto en la expresión de algunos de los principales co-receptores de células B implicados en el desarrollo de CG, ya que dichos receptores activan rutas de señalización que se han demostrado que son imprescindible en dicho proceso. Para ello, analizamos por citometría de flujo la expresión en membrana de CD40, ICOSL e IL-21R. Nuestros resultados muestran que los niveles de estos receptores son indistinguibles de los de ratones WT y deficientes en RRas1 (Figura 5C).

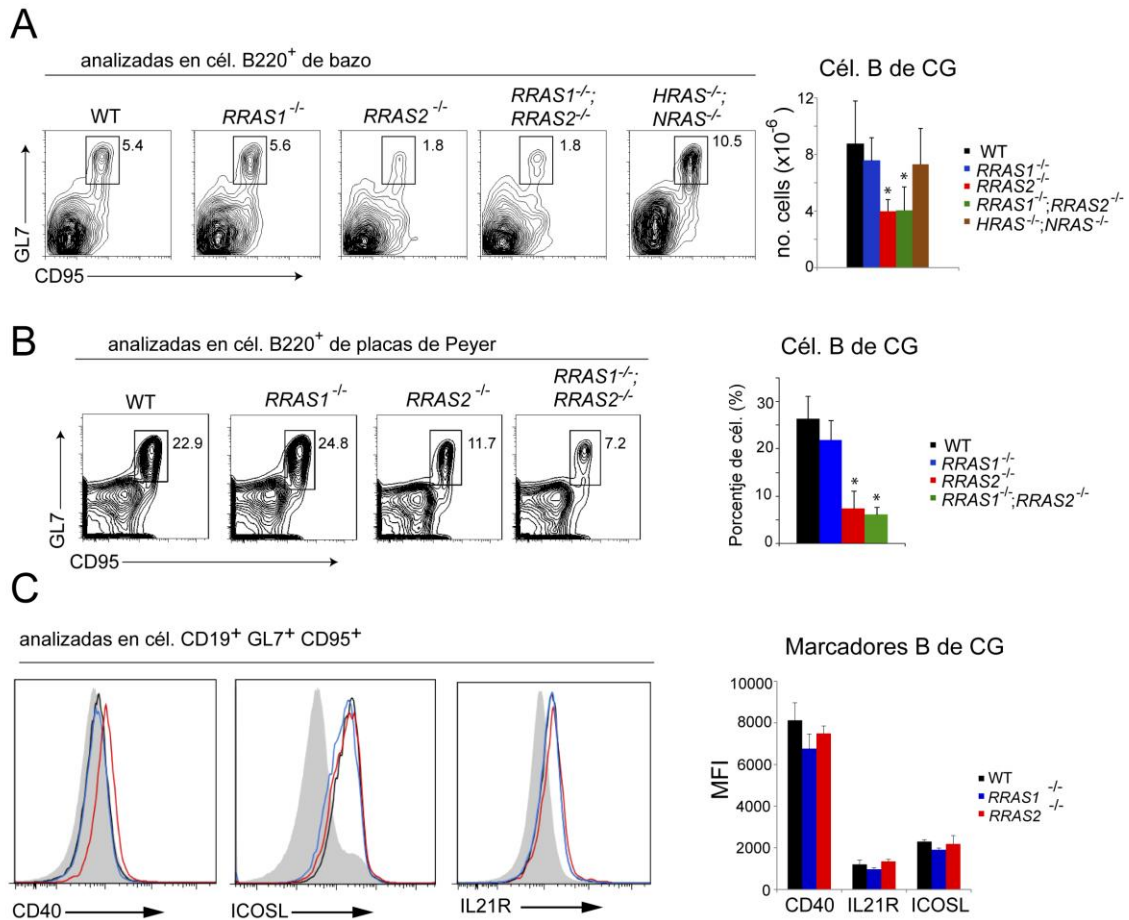


Figura 5. RRas2 desempeña un papel no redundante en la formación de centros germinales.

(A) Diagramas de citometría de flujo que muestran la expresión de los marcadores de CG GL7 y CD95 en células B B220⁺ de los ratones de los genotipos indicados 7 días tras la inmunización (p.i) con SRBC. Los recuadros indican el porcentaje de células de B con fenotipo de CG (GL7⁺CD95⁺). El número total de células B de CG se muestra en el gráfico de barras a la derecha. (n=3 por grupo).

(B) Diagramas de citometría de flujo y cuantificación del número total de células B de CG en placas de Peyer de ratones no inmunizados de los genotipos indicados (n=2 por grupo).

(C) Histogramas representativos que muestran la expresión de CD40, ICOSL, e IL21R en células B CD19⁺ GL7⁺ CD95⁺ de ratones WT, *RRAS1*^{-/-}, y *RRAS2*^{-/-}. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los tres marcadores se muestra en el gráfico de barras a la derecha (n=2 ratones por grupo).

Para verificar el defecto en CG observado por citometría de flujo, analizamos por microscopía confocal secciones de ganglios linfáticos mesentéricos extraídos de ratones inmunizados con SRBC y teñidos con un marcador general de células B (B220), un marcador específico de CG (GL7) y un marcador de una inmunoglobulina que aún no ha experimentado el cambio de clase (IgD). A través de esta técnica, observamos la acumulación de células B220⁺GL7⁺ (células B de CG) en los ganglios linfáticos de los

ratones WT, mientras que en el caso de los ganglios procedentes de ratones *RRAS2*^{-/-}, había menos células de este tipo y éstas se encontraban más dispersas, no encontrándose en muchos casos en las zonas B foliculares (zona rica en el marcaje para B220) (Figura 6A y B). Otra diferencia encontrada en estas secciones entre los animales WT y *RRAS2*^{-/-} fue una sobre-representación de células B B220⁺GL7⁺ que expresaban la inmunoglobulina inmadura IgD en ausencia de RRas2 (Figura 6A). Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que los datos de inmunohistoquímica apoyan la idea de que RRas2 se requiere para la formación y también la distribución normal de las células B de CG.

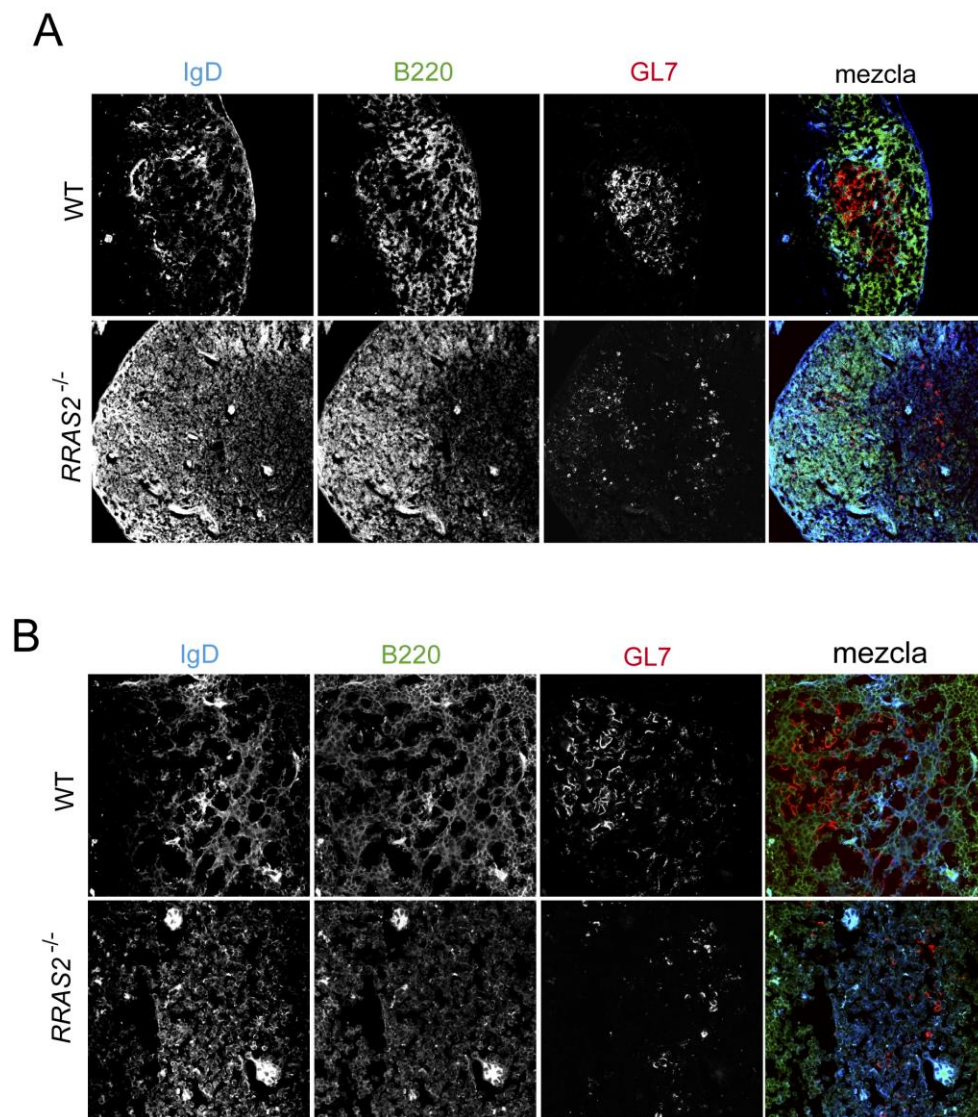


Figura 6. Inmunohistoquímica de centros germinales en ratones *RRAS2*^{-/-}.

(A) Inmunohistoquímica de secciones de bazo de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} teñidos con un marcador B (B220), un marcador de CG (GL7) y una inmunoglobulina previa al cambio de clase (IgD) 7 días tras la inmunización p.i con SRBC.

(B) Inmunohistoquímica de secciones analizadas con en (A) con un mayor aumento.

1.3. La deficiencia en *RRas2* causa un defecto en la generación de células B de CG específicas de antígeno y en las células memoria

Para confirmar el requerimiento específico de *RRas2* en la formación de CG en un segundo modelo, procedimos a inmunizar ratones con el hapteno nitrofenol acoplado a la gamma globulina de pollo (NP-CGG), para así poder monitorizar la formación de células B específicas de antígeno. Para ello, teñimos las células del bazo con un derivado del nitrofenol de alta afinidad (NIP, nitro-yodo-fenol) acoplado a BSA fluoresceinado, y también con un anticuerpo anti-IgG1, para así poder estudiar la formación de células B específicas de antígeno que habían experimentado el cambio de clase. La discriminación entre células B memoria y de CG se basó en la expresión del marcador B de memoria CD38 (Figura 7A; Hikida et al., 2009). De esta forma, pudimos comprobar que en los ratones *RRAS2*^{-/-} la formación de las células B de CG y de memoria estaba disminuida en comparación con la de los ratones WT o *RRAS1*^{-/-} (Figura 7B). De hecho, el número total de células B específicas de antígeno que habían hecho el cambio de clase (NIP⁺IgG1⁺) era significativamente menor en los ratones *RRAS2*^{-/-} comparado con los ratones de los otros dos genotipos, respaldando de nuevo la conclusión de que *RRas2* se requiere de forma selectiva para la formación de células B de CG.

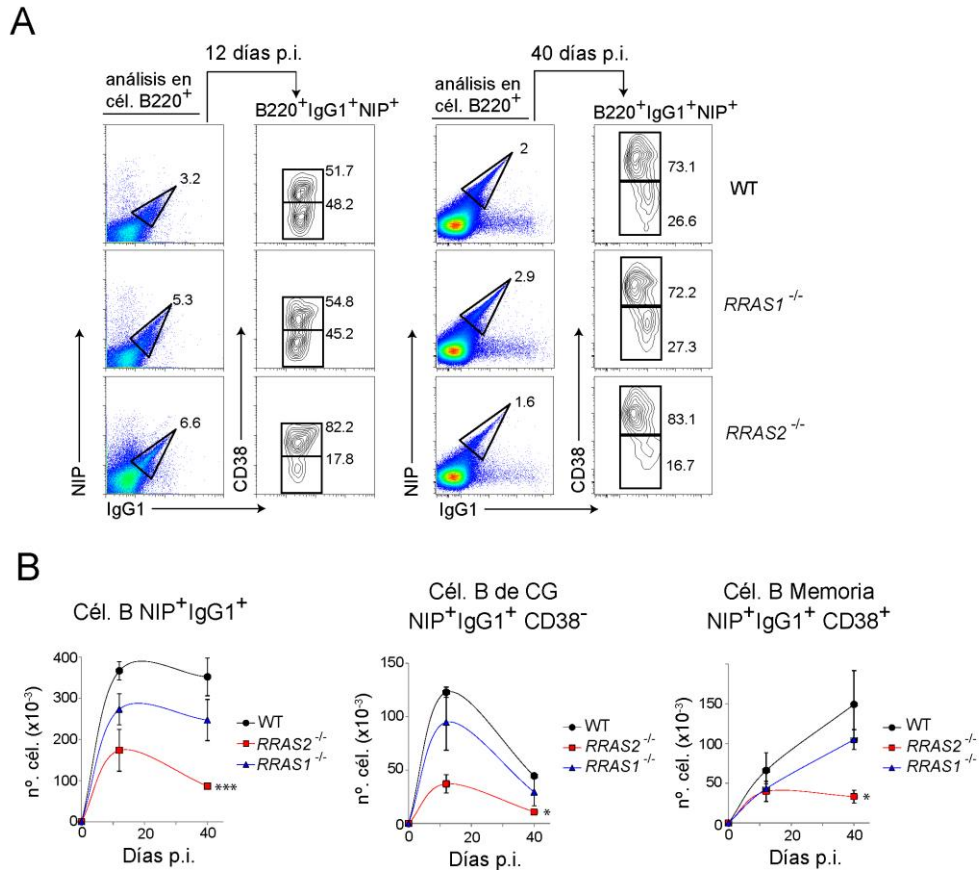


Figura 7. Defecto en las células B de CG específicas de antígeno en ratones *RRAS2*^{-/-}.

(A) Diagramas de citometría de flujo que muestran la presencia de células B (B220⁺) de CG (CD38⁻) específicas del antígeno (NIP⁺) y que han experimentado el cambio de clase (IgG1⁺), así como células B memoria (CD38⁺) en ratones inmunizados con NP-CGG. (B) Cuantificación del número total de células B de cada una de las poblaciones analizadas en (A): a la izquierda, células B totales específicas de antígeno y que han hecho el cambio de clase; en el centro el número total de células de CG dentro de la población anterior; y a la derecha el número total de células memoria.

1.4. El papel de RRas2 en la formación de CG es intrínseco de las células B

La reacción de los centros germinales está regulada por T_{FH}. Por tanto, un posible defecto en las células T_{FH} puede ocasionar una desregulación generalizada de los CG. Consecuentemente, quisimos analizar si en nuestros ratones *RRAS2*^{-/-} podría haber un defecto en las células T_{FH} que pudiera estar ocasionando el defecto de CG. Sin embargo, cuando analizamos la población de células T_{FH} en ratones *RRAS2*^{-/-}, encontramos que ésta era comparable a la de los ratones WT (Figura 8A). Asimismo, ratones deficientes en otras proteínas de la familia Ras (RRas1, HRas, NRas) tampoco presentaron ningún defecto en la formación de células T_{FH}. Además, también

encontramos que los niveles de expresión de co-receptores de las células T_{FH} deficientes en $RRas2$, tales como CD40L e ICOS no estaban afectados (Figura 8B). En conjunto, todos estos datos demuestran que la respuesta defectiva de CG de los ratones $RRAS2^{-/-}$ no se debe a anomalías en el número ni en el fenotipo de las células T_{FH} , e indican que derivan de un defecto intrínseco de las células B.

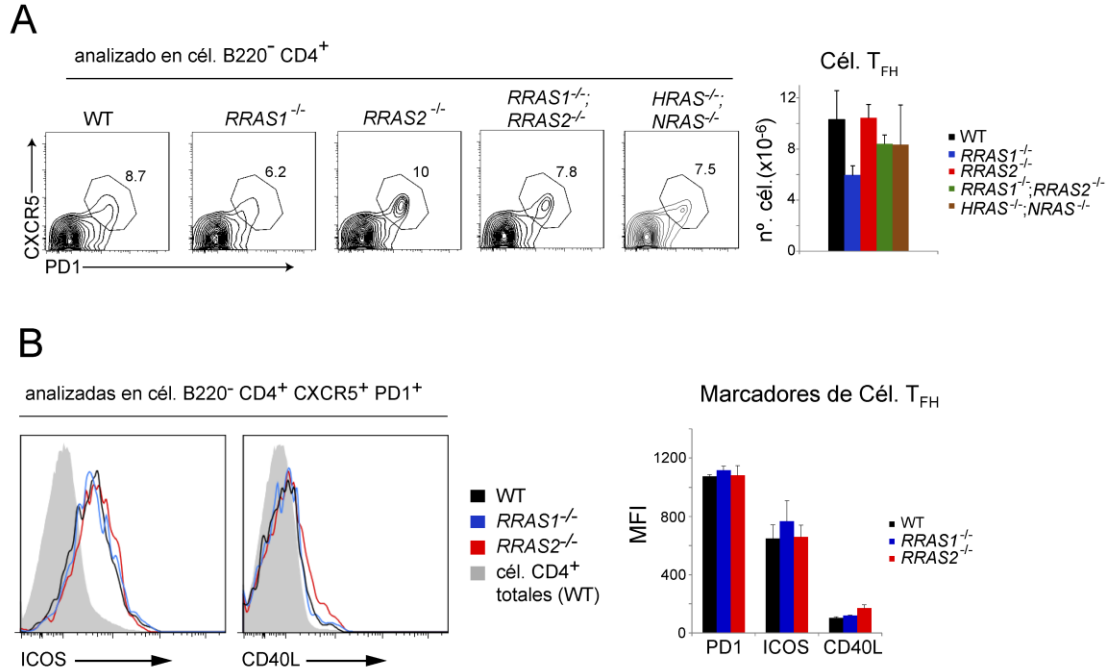


Figura 8. El papel de $RRas2$ en la formación de CG no es secundario a un defecto en las células T_{FH} .

(A) Diagramas de citometría de flujo que muestran la expresión de PD1 y CXCR5 en células T B220⁻ CD4⁺ de los genotipos indicados 7 días después de inmunizar p.i con SRBC. Los recuadros indican el porcentaje de células T con un fenotipo de célula TFH (PD1⁺ CXCR5⁺). El número total de células TFH se muestra en el gráfico de barras a la derecha (n = 3 por grupo).

(B) Histogramas representativos que muestran la expresión de los receptores de superficie de las células T_{FH} CD40L e ICOS analizados en células T B220⁻ CD4⁺ PD1⁺ CXCR5⁺ de ratones WT, $RRAS1^{-/-}$, y $RRAS2^{-/-}$. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de PD1, CD40 y CD40L se muestra en el gráfico de barras a la derecha (n = 2 ratones por grupo).

A pesar de que la ausencia de anomalías en la población de células T_{FH} (Figura 8) sugería que la deficiencia en células B de CG de los ratones $RRAS2^{-/-}$ no es secundaria a un defecto de células T, no podíamos descartar que otros tipos celulares afectados por la deficiencia en $RRas2$ influyeran, ya que es un ratón deficiente en la línea germinal. Para demostrar que el requerimiento de $RRas2$ para la formación de CG era intrínseco a las células B, realizamos experimentos de transferencia adoptiva en los que purificamos células B vírgenes procedentes de ratones WT o $RRAS2^{-/-}$ que expresan el marcador

CD45.2, y las inoculamos en ratones receptores CD45.1⁺ WT. Posteriormente a la inoculación, los ratones fueron inmunizados con NP-CGG y analizamos la diferenciación de las células B transferidas (CD45.2⁺) en células B de CG. Los resultados mostraron que hay un defecto dramático en la formación de células B de CG (NIP⁺IgG1⁺CD38⁻) dentro de la población B CD45.2⁺B220⁺ en ausencia de RRas2 (Figura 9). Dado que en este ensayo las células B inoculadas CD45.2⁺ *RRAS2*^{-/-} se encuentran en un contexto totalmente silvestre, estos resultados demuestran que el papel de RRas2 en la formación de CG es intrínseco a células B.

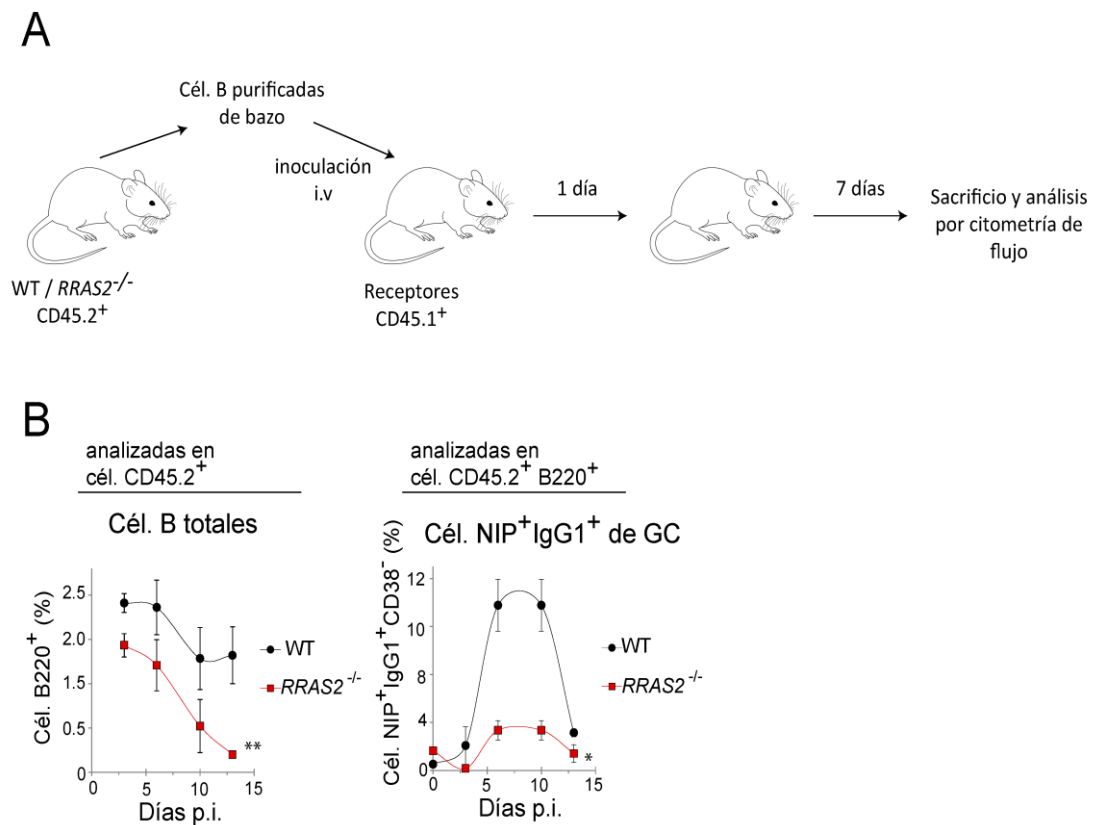


Figura 9. El defecto en la formación de células B de centro germinal en ausencia de RRas2 es intrínseco a las células B.

(A) Esquema del experimento de transferencia adoptiva: se inoculan por vía i.v células B purificadas de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} CD45.2⁺ en ratones receptores WT CD45.1⁺. 24 horas después se inmunizan los ratones con NP-CGG y las células de centro germinal específicas de antígeno se analizan 7 días p.i.

(B) Cuantificación del número total de células B con fenotipo de CG (CD38⁻) analizado en la población B B220⁺ CD45.2⁺ en los ratones aceptores CD45.1⁺ 7 días p.i.

1.5. RRas2 es necesario para la generación de anticuerpos de alta afinidad

Puesto que RRas2 es necesario para la formación de la células B de CG y esto es un pre-requisito para la hipermutación somática y el cambio de clase de las inmunoglobulinas, nos preguntamos si la deficiencia en RRas2 podría dar lugar a una producción ineficiente de inmunoglobulinas maduras específicas de antígeno de alta afinidad. En efecto, los ratones *RRAS2*^{-/-} inmunizados con NP-CGG presentan un defecto en la producción de anticuerpos específicos de antígeno, mostrando una importante reducción en la producción de inmunoglobulinas IgG1, tanto de baja como de alta afinidad. En el caso de las inmunoglobulinas del subtipo IgM, al ser ésta la primera inmunoglobulina que se expresa en células B inmaduras, existe una primera ola de producción de inmunoglobulina soluble de baja afinidad y que es independiente de la reacción de los CG, y una ola posterior de producción de IgM donde las células B ya han atravesado los CG y por tanto han experimentado la maduración de la afinidad. Consecuentemente con todos los resultados anteriores, en ratones *RRAS2*^{-/-} inmunizados encontramos una importante disminución en la producción de IgM de alta (y por tanto dependiente de CG) pero no de baja afinidad (Figura 10). Esta respuesta humoral deficiente es específica de los ratones *RRAS2*^{-/-}, ya que los ratones *RRAS1*^{-/-} y *NRAS*^{-/-}; *HRAS*^{-/-} generan respuestas normales o incluso un poco aumentadas con respecto a los ratones silvestres. El requerimiento específico de RRas2 para la generación de anticuerpos maduros de baja y alta afinidad, y el hecho de que precisamente no se requiera para la generación de IgM de baja afinidad, refuerza la idea de que RRas2 desempeña un papel específico y no redundante en la reacción de los CG.

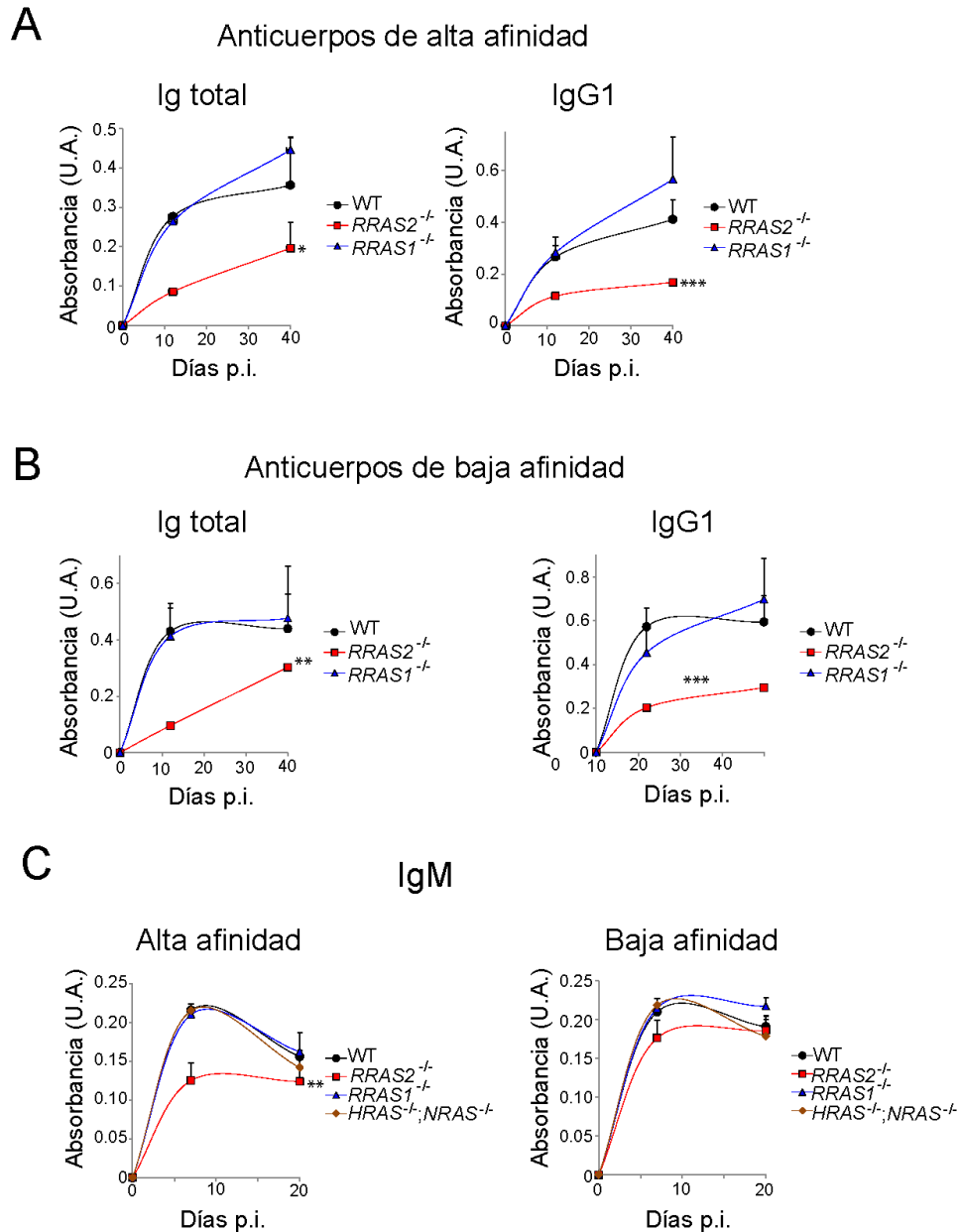


Figura 10. Los ratones $RRAS2^{-/-}$ presentan un defecto en la producción de anticuerpos específicos de hapteno.

(A) Medición mediante ELISA de inmunoglobulinas solubles totales e IgG1 de alta afinidad a partir de sueros de ratones WT, $RRAS1^{-/-}$, y $RRAS2^{-/-}$ inmunizados con NP-CGG durante diferentes tiempos (n=4 ratones por grupo y punto de tiempo).

B) Producción de inmunoglobulinas solubles de baja afinidad totales e IgG1 analizado como en (A) (n = 3 ratones por grupo y punto de tiempo).

(C) Producción de IgM de baja y alta afinidad medido mediante ELISA a partir de sueros de ratones WT, $RRAS1^{-/-}$, $RRAS2^{-/-}$, $HRAS^{-/-}$, $NRAS^{-/-}$ inmunizados con NP-CGG durante diferentes tiempos (n=3 ratones por grupo y punto de tiempo).

2. Las células B de CG deficientes en RRas2 se acumulan como centoblastos

2.1. Las células B de CG deficientes en RRas2 se acumulan presentan un defecto en la modulación negativa de IgD e IgM

Los estudios de inmunohistoquímica (Figura 6) nos sugirieron que, a diferencia de los controles WT, las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} no modulan negativamente la expresión de la IgD. Con el objetivo de determinar si las células B de los ratones *RRAS2*^{-/-} experimentan algún tipo de bloqueo durante la diferenciación de los CG, inmunizamos a ratones deficientes o bien en *RRas1*, o bien en *RRas2*, o a los dobles mutantes careciendo de ambas GTPasas. Para ello, inoculamos SRBC por vía intraperitoneal y examinamos la expresión en superficie de las distintas inmunoglobulinas en las células B de CG. Basándonos en la expresión de IgM e IgD, identificamos con claridad tres poblaciones distintas dentro de las células B de CG de los ratones WT a día 7 y día 14 post-inmunización (Figura 11A): una población doble positiva IgM⁺IgD⁺; una población que había regulado negativamente IgD pero todavía conservaba la expresión de IgM (IgM⁺IgD⁻); y una población que había perdido la expresión de ambas inmunoglobulinas (IgM⁻IgD⁻). Esta última población IgM⁻IgD⁻ se corresponde con células B maduras que ya han experimentado el cambio de clase ya que parte de dichas células expresaban IgG1 en superficie (Figura 11A). Cuando analizamos en términos de números absolutos cada una de estas subpoblaciones, vimos que había una gran proporción de células IgM⁺IgD⁺ en ratones silvestres a día 7 p.i., y que esa población disminuía a día 14 p.i. debido a su conversión en células de CG IgM⁺IgD⁻ y IgM⁻IgD⁻ (Figura 11B). Sin embargo, en el caso de los ratones *RRAS2*^{-/-} el número total de células de CG en estas tres subpoblaciones se veía dramáticamente disminuido a día 7 p.i., y estas diferencias persistían a día 14 p.i., siendo el defecto más acusado en el caso de las poblaciones IgM⁺IgD⁻ y IgM⁻IgD⁻ (Figura 11B). La distribución de las células B de CG en el caso de los ratones doble mutantes *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} es muy similar a la de los ratones *RRAS2*^{-/-}, mientras que la distribución observada en ratones *RRAS1*^{-/-} mostró una conversión acelerada de la población IgM⁺IgD⁺ a células IgM⁺IgD⁻ y IgM⁻IgD⁻ en comparación con ratones WT (Figura 11B). Estos datos nos sugieren que *RRas2* favorece el proceso de cambio de clase y que *RRas1* quizá pueda estar ejerciendo algún papel de regulación negativa de este proceso, una posibilidad interesante que aún queda pendiente de abordar. En ausencia de *RRas2*, las células B de CG se encuentran mayoritariamente en un estadio temprano en donde aún no ha habido cambio de clase de las inmunoglobulinas y no han modulado negativamente IgD ni IgM.

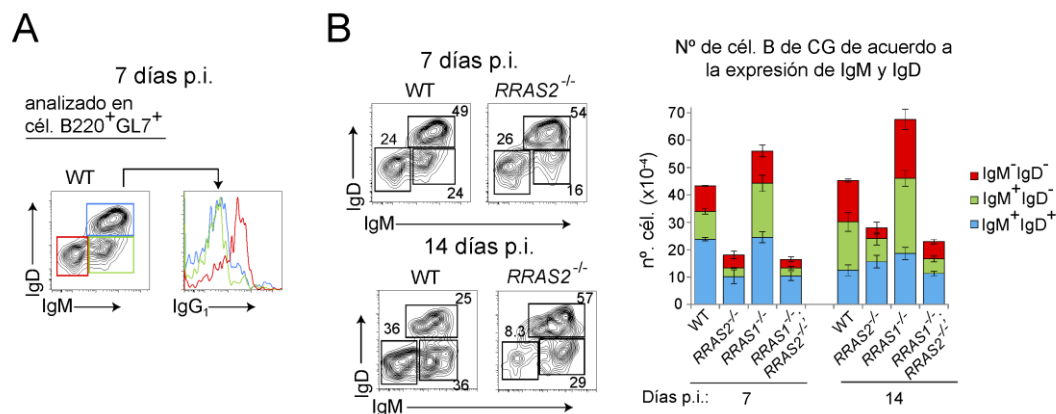


Figura 11. Las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} muestran un defecto en la modulación negativa de IgD e IgM.

(A) Diagrama de citometría de flujo que muestra la presencia de IgG₁ en superficie en células B de CG de ratones WT que han perdido la expresión de IgM e IgD. (B) Diagramas de citometría de flujo que muestran la pérdida de IgM e IgD en superficie a 7 y 14 días p.i. con SRBC. A la derecha se muestra la cuantificación de cada una de las tres poblaciones recuadradas en los diagramas de citometría (n = 3 ratones por grupo).

2.2. Las células B de CG deficientes en *RRas2* se acumulan en el estadio de centroblastos

Para determinar si la deficiencia en *RRas2* estaba alterando la distribución de células B de centro germinal entre las zonas clara y oscura, analizamos la expresión de CXCR4 en células de bazo de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} inmunizados con SRBC. Encontramos que había un incremento de al menos 3 veces en la proporción de células CXCR4⁺ dentro de la población de B de CG IgM⁺IgD⁺ en los ratones *RRAS2*^{-/-} comparados con los WT (Figura 12A). Otro marcador que sirve para distinguir las células de DZ y LZ es CD86, que expresa niveles altos en la zona clara (Victoria and Nussenzweig, 2012). Usando los marcadores para CXCR4 y CD86 pudimos calcular el cociente DZ/LZ en ratones *RRAS1*^{-/-}, *RRAS2*^{-/-} y en los dobles mutantes *RRAS1*^{-/-}*RRAS2*^{-/-}. Nuestros datos indican que la deficiencia en *RRas2* se asocia a un ratio DZ/LZ aumentado en comparación con los ratones WT, con los *RRAS1*^{-/-} o incluso con los ratones doble mutantes *RRAS1*^{-/-}*RRAS2*^{-/-} (Figura 12B y Figura 12C). Dicho aumento se detectó principalmente en las células B de CG más maduras (IgM⁻IgD⁻), pero también en los precursores IgM⁺IgD⁺ (Figura 12B). Por tanto, podemos concluir que en ausencia de *RRas2* las células B de CG se encuentran en su mayoría como células de zona oscura (DZ), reteniendo la expresión de IgM e IgD.

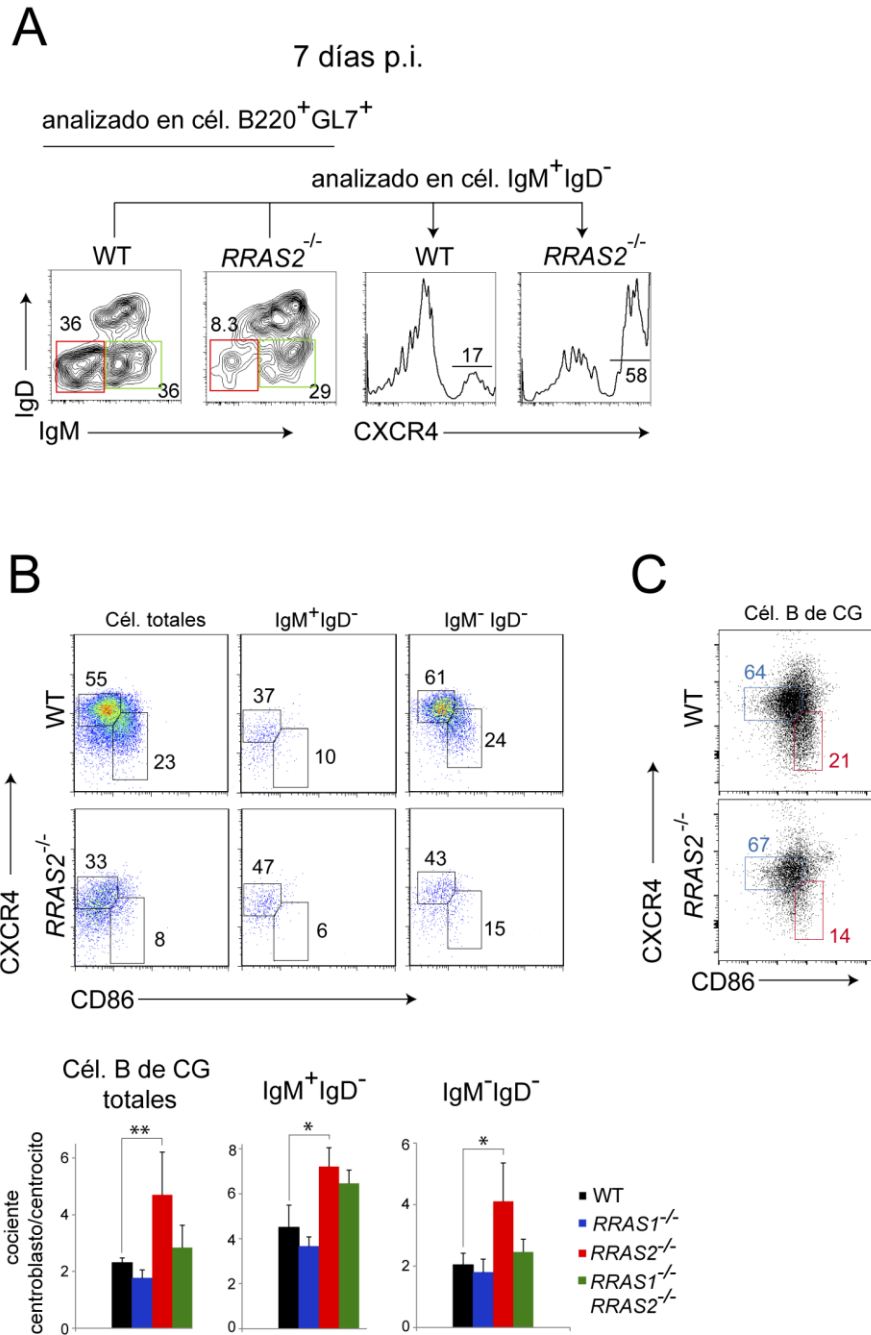


Figura 12. Las células B de CG de los ratones *RRAS2*^{-/-} se acumulan en la zona oscura.

(A) Diagramas de citometría de flujo que muestran la expresión en superficie de IgD a IgM en la población B de CG (izquierda) y en ratones WT y *RRAS2*^{-/-} inmunizados con SRBC y los respectivos histogramas de expresión de CXCR4 (derecha).

(B) Diagramas de citometría de flujo mostrando la expresión de CXCR4 y de CD86 en células B de CG totales así como de las IgM⁺IgD⁻ y de las IgM⁻IgD⁻ de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} inmunizados con SRBC. Las cuantificaciones de las mismas se muestran en los gráficos de barras abajo, y están expresadas como el cociente del número de centroblastos (CD86^{lo}CXCR4^{hi}) y de centrocitos (CD86^{hi}CXCR4^{lo}) (n = 3 ratones por grupo).

(C) Diagrama representativo de citometría de flujo de la expresión de CXCR4 y CD86 en células B de CG totales analizados como en (B).

2.3. Las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} se acumulan en el estadio G0/G1 del ciclo celular

Puesto que las células B de DZ se caracterizan por dividirse mucho y rápidamente, quisimos averiguar si el mayor cociente entre zona oscura y zona clara de los ratones *RRAS2*^{-/-} podía deberse a un aumento en su capacidad proliferativa. Para ello, analizamos el ciclo celular de estas células y encontramos que, en global, la población B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} se encuentra parcialmente parada en el estadio G0/G1. El mismo fenotipo se observa en el caso de los ratones *RRAS1*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} (Figura 13).

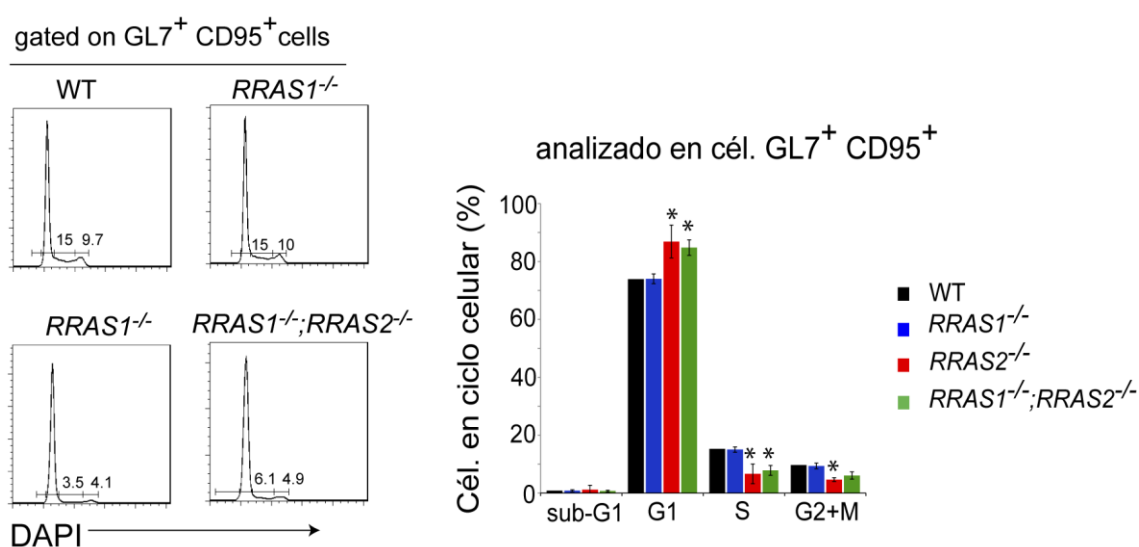


Figura 13. Las células B de CG deficientes en *RRas2* se acumulan en el estadio G0/G1 del ciclo celular.

Histograma representativo del análisis de ciclo celular en células B de CG B220⁺ GL7⁺ CD95⁺ mediante tinción con DAPI 7 días p.i con SRBC (izquierda), y gráfico de barras de la cuantificación correspondiente (derecha) (n = 3 ratones por grupo).

Por otro lado, también estudiamos la proliferación celular de las células de CG mediante la incorporación del análogo de la timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) después de inmunizar con SRBC ratones WT CD45.1⁺ que habían recibido una transferencia adoptiva de células B purificadas de ratones WT, *RRAS2*^{-/-} o *RRAS1*^{-/-}. En este contexto, pudimos comparar la distribución de las poblaciones de DZ y LZ de las células B de CG en fase S en ausencia de *RRas2* de forma intrínseca y específica de células B, y compararla con los controles WT. El porcentaje de células B de CG que habían incorporado BrdU y que expresan altos niveles del marcador de DZ CXCR4 fue mayor (cerca del doble) en ausencia de *RRas2* en comparación con las células WT control y, al contrario, el porcentaje de células B de CG que expresan bajos niveles de

CXCR4 (LZ) y que habían incorporado BrdU se había reducido a la mitad (Figura 14A y B). En conjunto, todos estos resultados indican que las pocas células B de CG en fase S que se encuentran en los ratones *RRAS2*^{-/-} son fundamentalmente células de zona oscura (DZ), o centroblastos, mientras que las células B de LZ se quedan paradas en el estadio G0/G1.

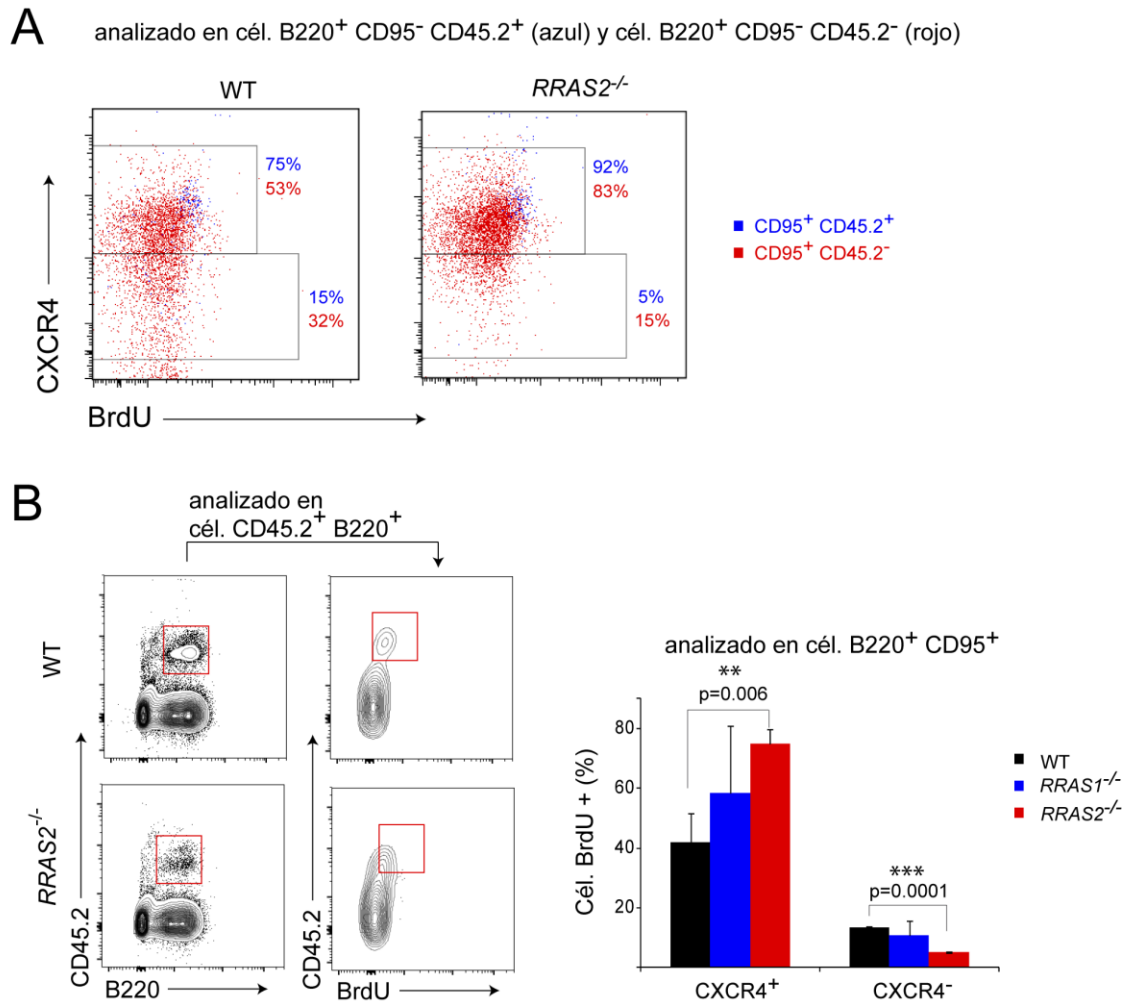


Figura 14. Las células B deficientes en *RRas2* que se encuentran en división presentan marcadores de zona oscura.

(A) Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra la Incorporación de BrdU en células CD45.2⁺ (del donante WT o *RRAS2*^{-/-}) y CD45.2⁻ (células endógenas procedentes del ratón receptor) en el modelo de transferencia adoptiva. Se inyectaron células B vírgenes purificadas de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} en ratones CD45.1⁺ WT. Posteriormente inmunizamos con SRBC e inyectamos BrdU a los 7 días p.i 5 horas antes del análisis por citometría de flujo.

(B) Diagrama de citometría de flujo en forma de contorno que muestra la incorporación de BrdU específicamente en las células WT o *RRAS2*^{-/-} procedentes de los ratones donantes. A la derecha se muestran los gráficos de barras con la cuantificación correspondiente (n = 4 ratones por grupo).

Otro método para estudiar la proliferación de las células B de CG en ausencia de RRas2 es por inmunohistoquímica. Tratando a los ratones *in vivo* con BrdU, pudimos detectar células positivas para BrdU en la población GL7⁺ en los ratones WT pero no en los *RRAS2*^{-/-} (ver flechas rojas en la Figura 15A; las imágenes por separado se muestran en la Figura 15B). Dichos ratones *RRAS2*^{-/-} presentan restos celulares anucleados que se tiñen de forma inespecífica (ver flechas blancas en la Figura 15A). Estos resultados confirman que RRas2 es necesario para la proliferación de las células B de CG e indican que el defecto en el cambio de clase de las inmunoglobulinas y en la maduración de la afinidad observada en ausencia de RRas2 está causado probablemente por el hecho de que las células B de CG no estén recibiendo señales proliferativas cuando se encuentran en el estadio de la zona clara (LZ).

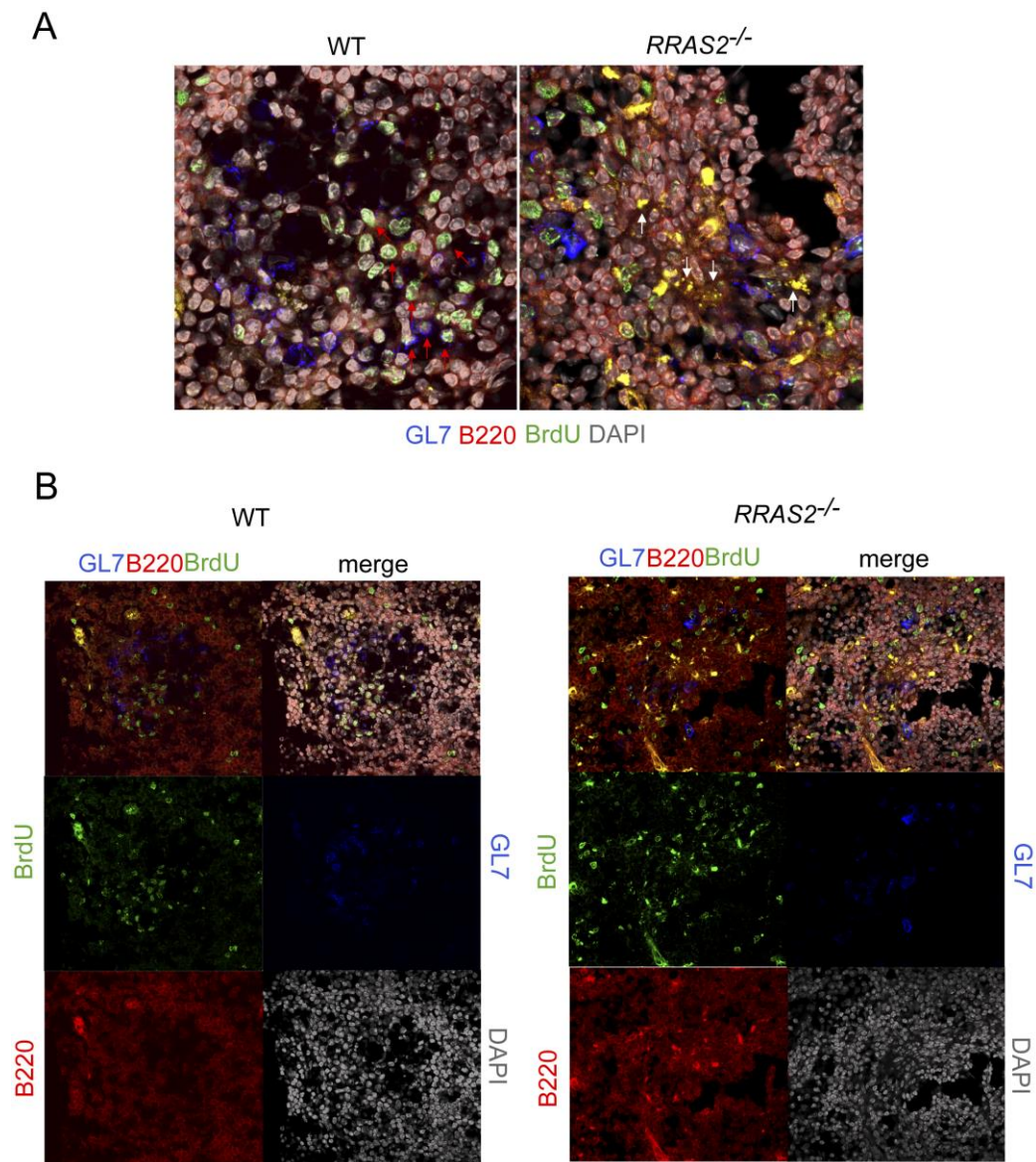


Figura 15. Las células B de CG de ratones $RRAS2^{-/-}$ presentan un defecto proliferativo *in vivo*.

(A) Análisis *in vivo* de la incorporación de BrdU en células B de CG en cortes de inmunohistoquímica de bazo de ratones inmunizados con SRBC. El análisis se hizo 7 días p.i y 5 horas después de inyectar con BrdU intraperitoneal con anticuerpos para detectar B220, GL7 y BrdU. Las flechas rojas indican la presencia de células B de CG en fase S en el momento de la administración del BrdU; las flechas blancas indican la presencia de restos celulares que tiene un marcaje no específico, ya que dichos restos carecen de núcleos como se observa por la tinción con DAPI. B) Imágenes tomadas por separado correspondientes a la inmunohistoquímica mostrada en (A).

3. Defecto en la proliferación B en respuesta a los estímulos del BCR y CD40 en ausencia de RRas2

3.1. Las células B deficientes en RRas2 tienen un defecto proliferativo en respuesta a estímulos del BCR y de CD40

Según el modelo actual, se cree que la proliferación de las células B de CG comienza durante su paso por la zona clara (LZ), cuando dichas células reciben estímulos tanto del receptor de células B (BCR) como del co-receptor CD40, mientras que la proliferación de estas células en la zona oscura (DZ) es independiente de dichos estímulos (Bannard et al., 2013). Por tanto, nos planteamos si la señalización mediada por el BCR y/o por CD40 pudiera estar afectada en ausencia de RRas2. Desafortunadamente, no pudimos purificar células B de CG en cantidades suficientes como para realizar ensayos bioquímicos, o cultivarlas durante periodos largos de tiempo debido a su alta predisposición a la apoptosis. Sin embargo, sí pudimos analizar la proliferación de las células B vírgenes en respuesta a los estímulos de BCR y de CD40, y encontramos que ésta se encontraba muy reducida en ausencia de RRas2 (Figura 16A). Con el objetivo de estudiar si este defecto proliferativo observado *in vitro* se produce también en condiciones *in vivo*, realizamos experimentos de transferencia adoptiva en los que ratones receptores WT CD45.1⁺ recibieron células B procedentes de ratones WT o deficientes en RRas2. Las células transferidas fueron marcadas con CellTrace Violet, de forma que analizando su dilución pudimos calcular el número de divisiones de células B 6 días después de la inmunización con SRBC. Estos datos demuestran un defecto específico de las células en la proliferación inducida por antígenos en ausencia de RRas2 *in vivo* (Figura 16B). Por otro lado, los resultados sugieren que RRas2 se encuentra por debajo en las rutas de señalización de los dos receptores de membrana mencionados, y que la señalización ineficiente del BCR y/o CD40 podría ser la causa del defecto de los CG en los ratones *RRAS2*^{-/-}.

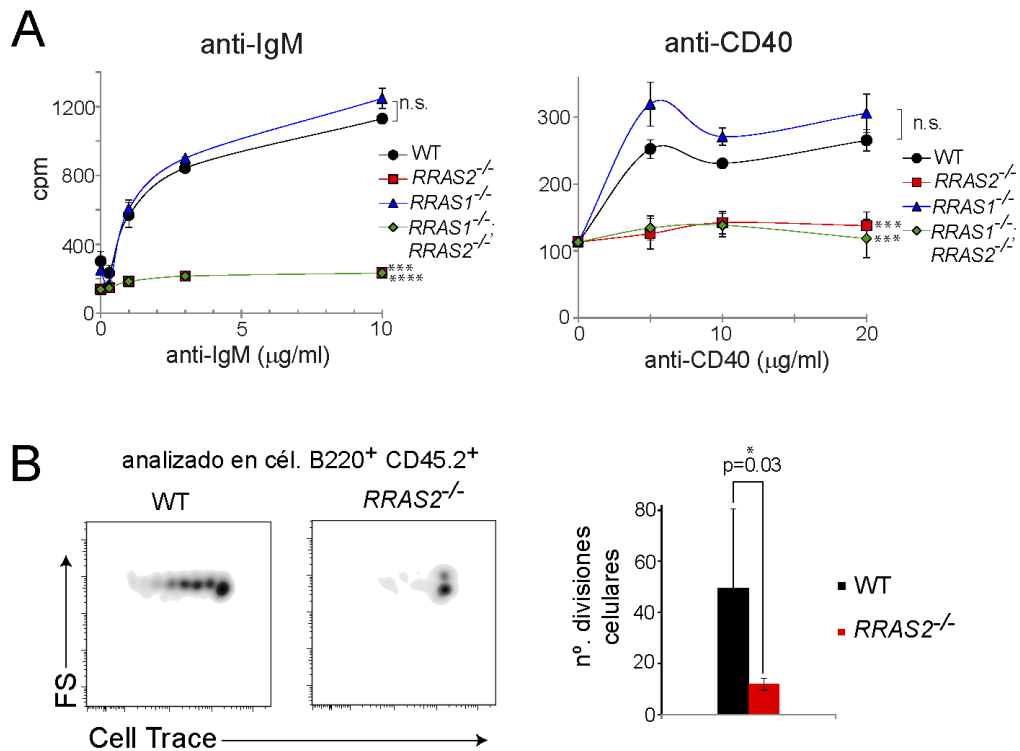


Figura 16. Defecto en la proliferación de las células B de CG en ausencia de RRas2.

(A) Proliferación de las células B vírgenes purificadas tras estimular durante 3 días con anti-IgM o con anti-CD40 analizada mediante la incorporación de timidina tritiada ($n = 2$ ratones por grupo medidas por triplicado).

(B) Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra la proliferación dependiente de antígeno *in vivo* en un modelo de transferencia adoptiva. Purificamos células B de ratones WT o $RRAS2^{-/-}$, las marcamos con CellTrace Violet y las inoculamos por vía i.v en ratones WT CD45.1⁺. 6 días p.i analizamos la proliferación B por citometría de flujo de acuerdo con la dilución del CellTrace Violet en células B220⁺CD45.2⁺ ($n = 4$ ratones por grupo). La cuantificación se muestra en el gráfico de barras de la derecha.

3.2. Las células B deficientes en RRas2 tienen un defecto en la activación de la vía de señalización P13K/Akt

Previamente en nuestro laboratorio hemos descrito que RRas2 es esencial para la vía PI3K en respuesta a la activación tónica del BCR, pero no para la vía de ERK (Delgado et al., 2009). La activación de PI3K es fundamental para la proliferación de las células B mediada por el BCR (Okkenhaug and Vanhaesebroeck, 2003). Por otro lado, se sabe que RRas2 recluta y activa a la subunidad catalítica p110 δ de PI3K, que a su vez tiene un papel esencial en la formación de los centros germinales (Jou et al., 2002, Omori and Rickert, 2007). Por todos estos antecedentes, nos preguntamos si el defecto

en PI3K podría ser la causa de la menor capacidad proliferativa de las células B de ratones *RRAS2*^{-/-} en respuesta a la estimulación del BCR y CD40. Una de las moléculas efectoras dependientes de PI3K más importantes es Akt, la cual es reclutada a la membrana plasmática a través de la unión del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). En la membrana, Akt se fosforila en el residuo T308 por PDK1, otra quinasa dependiente de PIP3, y en la S473 por mTORC2. Como resultado de estas dos fosforilaciones, Akt activa el complejo de mTORC1, que a su vez fosforila a la quinasa p70S6 en la S235. Usando anticuerpos específicos de estos residuos fosforilados encontramos que RRas2 es necesario para que se den las siguientes fosforilaciones en respuesta a la estimulación del BCR: fosforilación de Akt en los residuos T308 y S473, fosforilación de p70S6 en la S235 (Figura 17A y B), y fosforilación de PDK1 en la S241 (Figura 17C). Sin embargo, vimos que RRas2 no se requería para la fosforilación de ERK por MEK en los residuos T202 / Y204 (Figura 17A). Estos datos son consistentes con el déficit general de la activación de la vía PI3K/Akt por el BCR. De forma interesante, la ausencia de RRas2 también causa una reducción en la fosforilación de Akt, PDK1, p70S6 y ERK en respuesta a la estimulación con anti-CD40 (Figura 17A, B y C), lo cual sugiere que también se requiere a RRas2 para la activación de ambas vías PI3K/Akt y Raf/ERK por parte de CD40 en células B vírgenes.

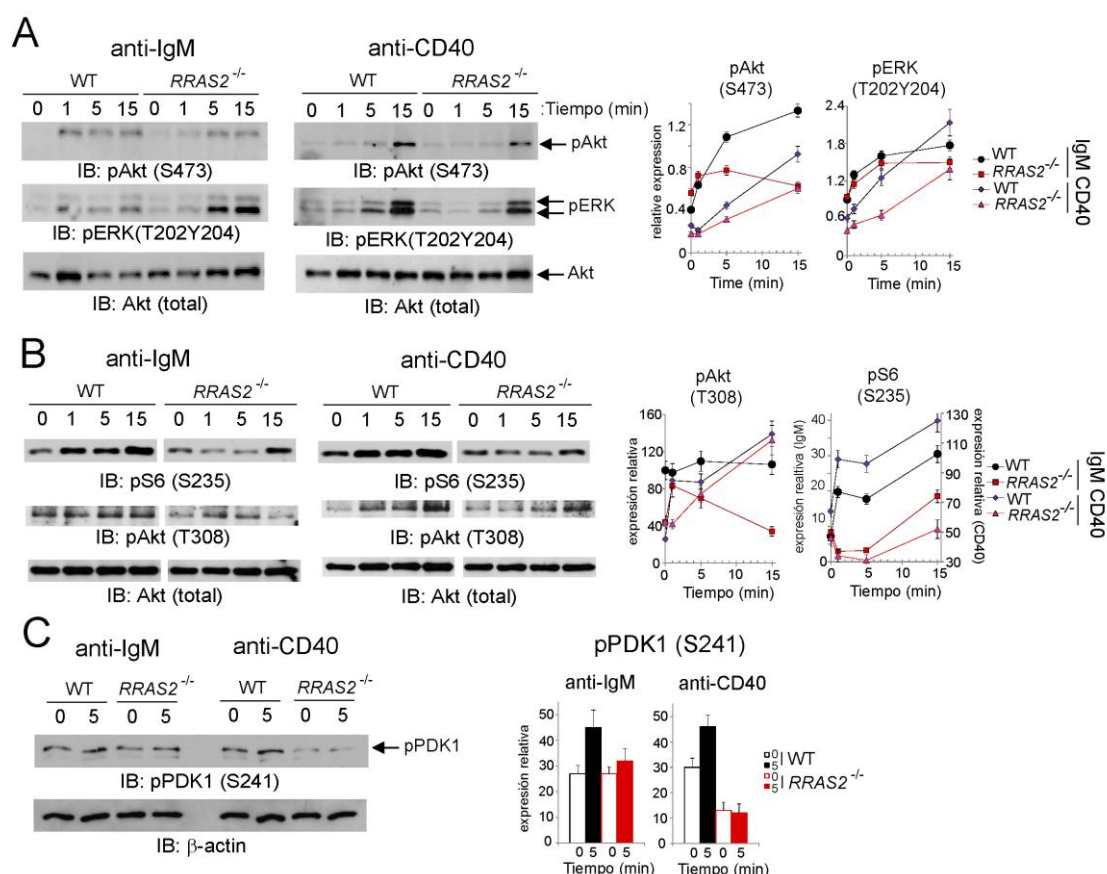


Figura 17. Las células B deficientes en *RRas2* tienen un defecto en la activación de PI3K/Akt.

(A) Western blot representativo que muestra la fosforilación de Akt y de ERK en células B purificadas de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} en respuesta a estímulos del BCR (anti-IgM) y de CD40 (anti-CD40) a diferentes tiempos.

(B) Western blot representativo que muestra la fosforilación de la proteína S6 y de Akt en estimulaciones realizadas como en (A).

(C) Western blot representativo que muestra la fosforilación de PDK1 en estimulaciones realizadas como en (A).

Las cuantificaciones de al menos 3 experimentos independientes se muestran respectivamente en los gráficos de la derecha.

Con el objetivo de comprobar si estos mismos defectos se observaban en la población de células B de CG, utilizamos los anticuerpos específicos de las fosforilaciones mencionadas de Akt y ERK para el análisis por citometría de flujo en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-IgM y anti-CD40 (Figura 18). De acuerdo con lo esperado en base a los resultados anteriores, vimos que *RRas2* y no *RRas1* se necesita para la fosforilación de Akt mediada por el BCR, y para la fosforilación de Akt y de ERK mediada por CD40 en las células B de CG.

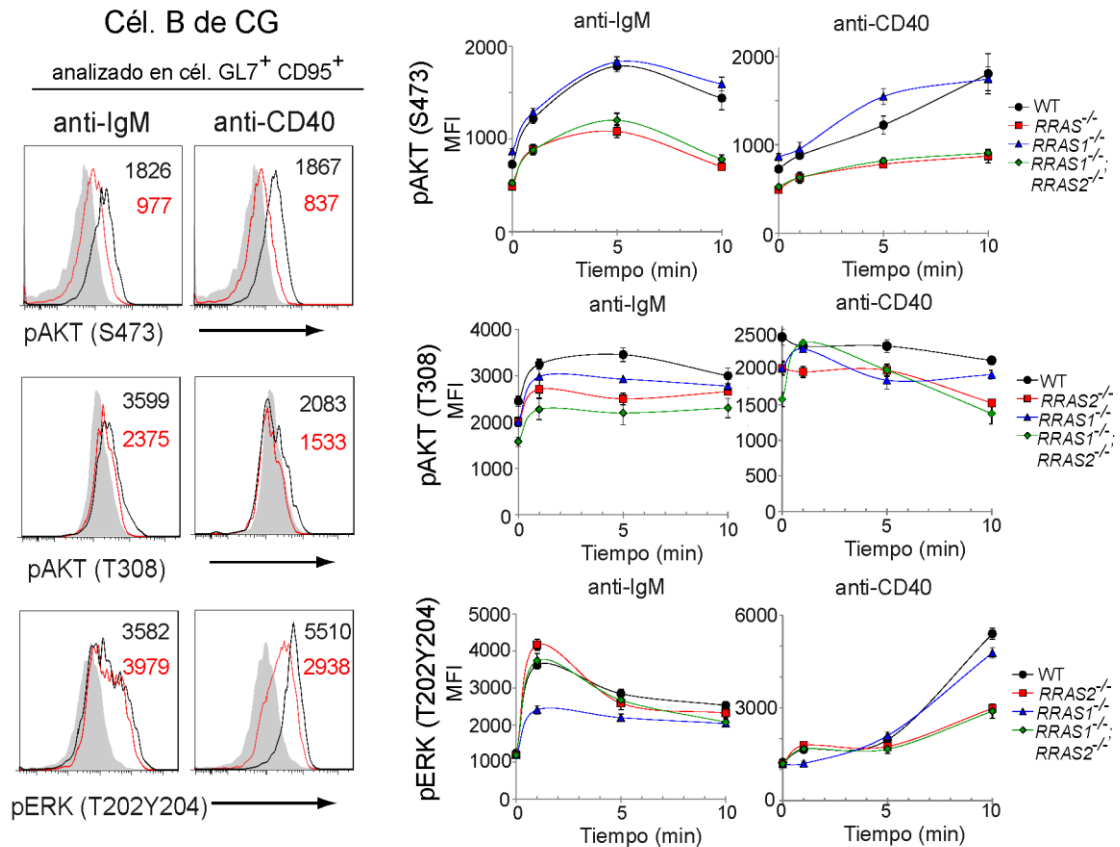


Figura 18. Activación defectuosa de la vía PI3K/Akt en células B de CG en ausencia de RRas2.

Histogramas de citometría de flujo que muestran la fosforilación de Akt y ERK en células B de CG GL7⁺ CD95⁺ procedentes de bazos 7 días p.i con SRBC y estimulados con anti-IgM o con anti-CD40 (n= 2 ratones por grupo). Todas las medidas se han hecho por triplicado.

Una de las dianas más importantes de Akt es el factor de transcripción FoxO1, que promueve la expresión de genes involucrados en el ciclo celular y la apoptosis (Werner et al., 2010). La fosforilación de FoxO1 en la T24 por parte de Akt promueve su degradación proteasomal bloqueando por tanto la transcripción y represión transcripcional de los genes diana relacionados con el ciclo celular y la apoptosis. Encontramos que la fosforilación de FoxO1 por parte de Akt estaba reducida significativamente en las células B de ratones deficientes en RRas2 en comparación con los ratones WT (Figura 19A).

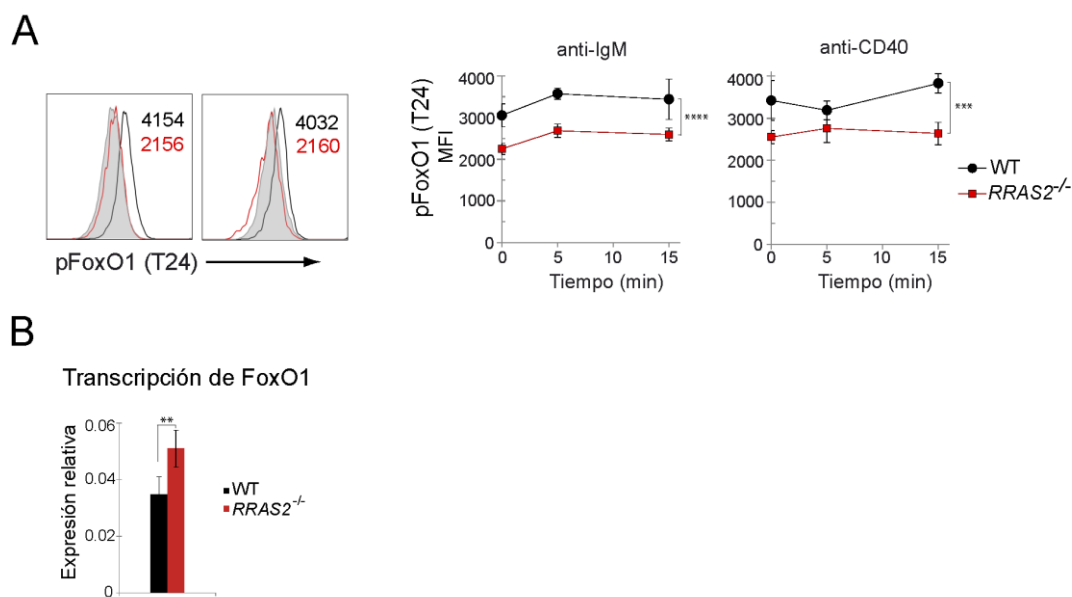


Figura 19. La regulación de FoxO1 está alterada en ausencia de RRas2.

(A) Diagrama de citometría de flujo que muestra la fosforilación de FoxO1 analizado en células B procedentes de los ratones de los genotipos indicados (n = 3 ratones por grupo).

(B) Análisis de la expresión de FoxO1 por RT-qPCR en células B purificadas de (n = 3 ratones por grupo).

Por otro lado, también se ha descrito que PI3K controla la actividad de FoxO1 a nivel transcripcional (Essaghir et al., 2009). Para verificar si la deficiencia en *RRas2* también altera la transcripción de este gen, analizamos la expresión de FoxO1 por RT-qPCR en células B totales. La expresión de FoxO1 a nivel de ARN mensajero es significativamente mayor en las células B de los ratones *RRAS2*^{-/-} en comparación con los ratones WT (Figura 19B). Por tanto, estos datos indican que *RRas2* se encuentra por debajo del BCR y de CD40 en términos de activación de PI3K/Akt en células B, incluyendo a la subpoblación B de CG, y que las células B de los ratones *RRAS2*^{-/-} presentan una actividad PI3K reducida en comparación con las células WT.

4. *RRas2* es necesario para la activación de la vía no canónica de NFκB en células B

La proteína “B-cell lymphoma 6” (Bcl6) es un represor transcripcional que actúa como un regulador maestro en la diferenciación de los CG (Basso and Dalla-Favera, 2010, Rui et al., 2011). Entre los genes diana de Bcl6, hay genes que están involucrados en el control de la apoptosis y del ciclo celular, de forma que se promueve una alta tasa de proliferación y tolerancia al daño en el ADN en la población B de CG, así como la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl2. Bcl6 reprime la expresión de *PRDM1* y

de IRF4, el primero de los cuales codifica para el regulador maestro Blimp-1 que favorece la diferenciación plasmacítica, y el segundo de los cuales promueve a su vez la expresión de Blimp-1, en un ciclo de retroalimentación positiva. Blimp-1 reprime a Bcl6, favoreciendo la salida de las células de la reacción de CG hacia una diferenciación terminal. Para comprobar si la expresión de estos genes, claves en el desarrollo de la respuesta de CG, estaba alterada en ausencia de RRas2, purificamos células B de CG por citometría de flujo y analizamos la expresión de Bcl6, Blimp-1, IRF4 y Bcl2 por RT-qPCR. Los resultados muestran que la expresión de Bcl6 y Bcl2 es significativamente mayor en las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} que en los controles WT, mientras que la expresión de IRF4 y Blimp-1 se encuentra significativamente reducida en las células B de CG de los ratones deficientes en RRas2-en comparación con los WT (Figura 20).

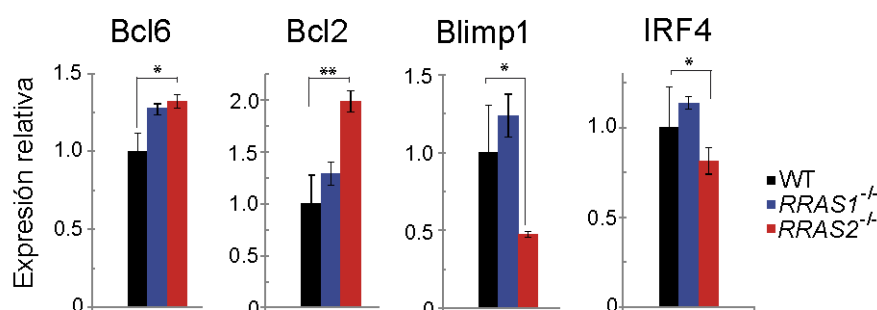


Figura 20. Transcripción alterada de genes clave de la reacción de centros germinales en ausencia de RRas2.

Análisis de la expresión de factores de transcripción clave para la reacción de CG medida por RT-qPCR, a partir de células B de CG purificadas de ratones inmunizados con SRBC (n = 3 ratones por grupo).

4.1. RRas2 es necesario para la activación de la vía no canónica de NFκB

Tanto IRF4 como Blimp-1 están implicados en la regulación negativa de Bcl6 y en la salida del programa de CG (Basso and Dalla-Favera, 2010). En la membrana plasmática, esta regulación negativa de Bcl6 está promovida por la señalización procedente del BCR y de CD40 en las células B de zona clara (LZ). Más concretamente, la activación de la vía de NFκB por parte de ambos receptores de membrana parece ser clave para aumentar la expresión de IRF4, lo cual a su vez es fundamental para la represión de Bcl6. Dado que IRF4 se expresa menos en los ratones *RRAS2*^{-/-} que en los WT (Figura 20), quisimos abordar si la activación de NFκB por parte del BCR y de CD40 estaba afectada en ausencia RRas2. Los receptores de membrana pueden activar a NFκB a través de dos vías: la clásica o canónica y la alternativa o no canónica. Con el

objetivo de caracterizar el efecto de la deficiencia en RRas2 en la activación de NFκB en células B, hicimos en primer lugar un ensayo de ELISA con sondas de ADN, para comprobar la presencia de las formas activas de NFκB en el núcleo de células B estimuladas. En comparación con los controles, las células B de los ratones *RRAS2*^{-/-} mostraban un déficit marcado en la translocación de p52 y de RelB tras la estimulación tanto con anti-IgM y con anti-CD40 (Figura 21A), mientras que la activación de p65, p50 y c-Rel no se encontraba afectada. Estos resultados indican que RRas2 es necesario para activación de la vía alternativa de NFκB pero no para la activación de la vía clásica en células B en respuesta a los estímulos de BCR y de CD40. Para determinar si el transporte del heterodímero p52/RelB estaba alterado en las células B deficientes en RRas2, analizamos los extractos nucleares de las células B activadas por inmunoblot. Tal y como esperábamos, encontramos que la translocación al núcleo de RelB y de p52 estaba afectada en ausencia de RRas2 (Figura 21B), lo que sugiere que RRas2 ejerce un papel regulador de la vía no canónica de NFκB en células B.

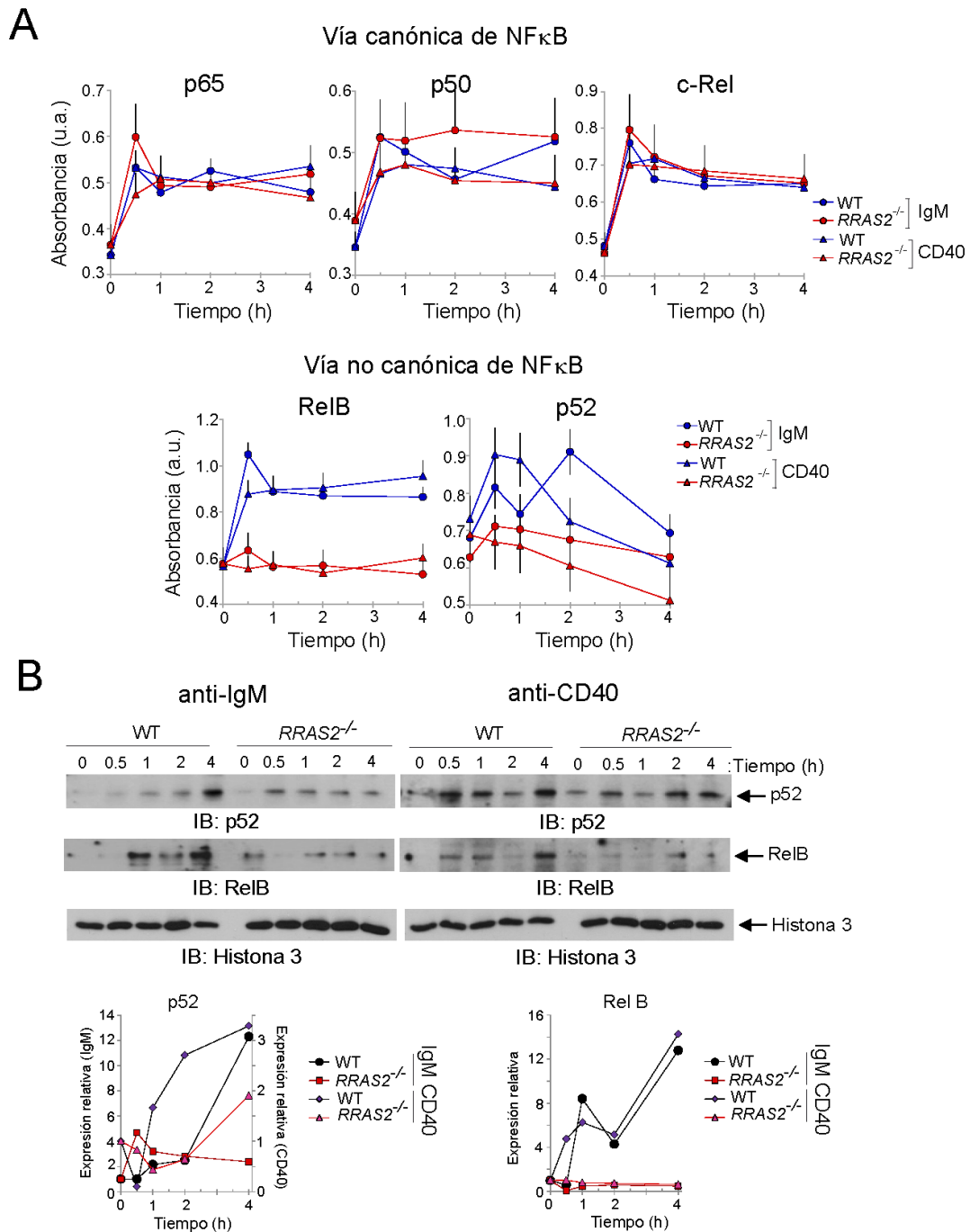


Figura 21. RRas2 es necesario para la activación de la vía no canónica de NF κ B en células B.

(A) Análisis de la activación de la vía canónica y no canónica de NF κ B en extractos nucleares de células B purificadas estimuladas con anti-IgM o con anti-CD40 usando el kit de ELISA de Actif Motif (n = 7 ratones por grupo).

(B) Inmunoblot de extractos nucleares de células B naif purificadas y estimuladas con anticuerpos que muestra la translocación de los factores de transcripción de la vía no canónica p52 y RelB.

4.2. RRas2 activa a NFκB a través de un mecanismo dependiente de PI3K

La función de RRas2 como activador de la vía de PI3K en diferentes tipos celulares ha sido ampliamente descrita (Figura 17, Figura 18; y Delgado et al., 2009, Rong et al., 2002, Rosario et al., 2001), sin embargo su papel como activador de las vías de NFκB era desconocida hasta ahora. No obstante, sí se había descrito que en células tumorales el efector Akt, por debajo de PI3K, activa la vía no canónica de NFκB fosforilando el residuo T23 en los homodímeros IKKα (Kloo et al., 2011, Ozes et al., 1999). Por tanto, nos planteamos estudiar si Akt fosforila a IKKα en el residuo T23 en células B, y comprobamos que la estimulación de las células B con anti-IgM durante 2 horas produce un pico máximo en la fosforilación del residuo de T23. Dicha inducción no se da en presencia del inhibidor de Akt VIII, lo cual sugiere que la activación del BCR promueve la fosforilación de IKKα mediada por Akt (Figura 22A). En consecuencia, quisimos comparar la fosforilación de la T23 de IKKα inducida por la activación del BCR y de CD40 en células B deficientes en RRas2 en comparación con las células WT. Comprobamos que la deficiencia en RRas2 causa una disminución de la fosforilación de IKKα en respuesta a ambos estímulos (Figura 22B). Debido a la dificultad en analizar por bioquímica las células B de CG debido al escaso número que se obtiene de éstas (especialmente en el caso de los ratones *RRAS2^{-/-}*), estudiamos estas rutas en CG mediante citometría de flujo de fosfoproteínas. Encontramos un defecto similar al de las células B analizadas por WB, estimulando las células con anticuerpos anti-IgM y anti-CD40 (Figura 22C). Estos resultados indican que RRas2 es necesario para la fosforilación de IKKα mediada por Akt, lo cual establece un vínculo entre la activación de las vías de PI3K y la no canónica de NFκB.

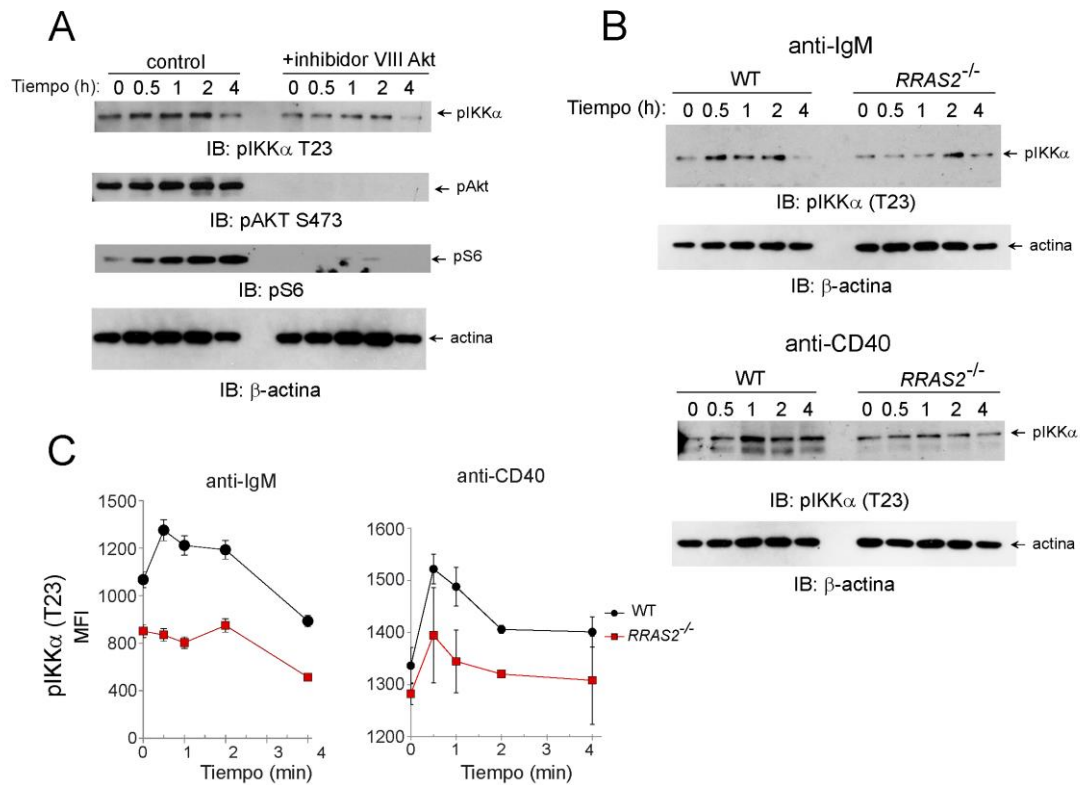


Figura 22. RRas2 controla la fosforilación de IKKα a través de Akt.

(A) La fosforilación de IKKα en el residuo T23 está mediada por Akt. Los inmunoblots muestran los lisados de células B purificadas totales procedentes de ratones WT tras estimular las células con anti-IgM en presencia o ausencia del inhibidor Akt VIII.

(B) RRas2 es necesario para la fosforilación de IKKα mediada por Akt en respuesta a los estímulos del BCR y de CD40. El inmunoblot muestra la fosforilación de la T23 de IKKα en lisados totales de células B purificadas primarias procedentes de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} estimuladas con anti-IgM o con anti-CD40.

(C) RRas2 es necesario para la fosforilación de IKKα mediada por Akt en células B de CG. Análisis por citometría de flujo mostrando la fosforilación de la T23 de IKKα después de estimular con anti-IgM o anti-CD40 las células de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} inmunizados con SRBC. Los datos representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la fosforilación de la T23 de IKKα en células B de CG con el fenotipo B220⁺ GL7⁺CD95⁺ (n = 2 ratones por grupo, medidos por triplicado en dos experimentos independientes).

Previamente, habíamos identificado a RRas2 como un efector directo del BCR y del TCR que se une a estos receptores de antígeno de manera constitutiva (Delgado et al., 2009). De acuerdo con el presente estudio, RRas2 también es un efector de CD40 en células B, y por este motivo también nos planteamos si RRas2 podría estar físicamente asociada a CD40. Encontramos que RRas2, pero no las Ras clásicas, se co-purificó con CD40 independientemente de la activación (Figura 23). Este resultado sugiere que la

asociación directa de RRas2 a los receptores de membrana podría ser algo en común en los mecanismos de acción de esta GTPasa.

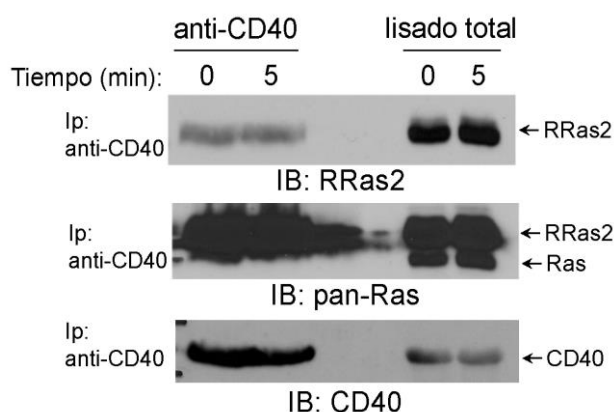


Figura 23. RRas2 se asocia de forma constitutiva con CD40 en células B.

Immunoblot que muestra la co-purificación de RRas2 con CD40 en células B WT sin estimular o estimuladas con anti-CD40 durante 5 minutos. Tras la incubación con el anticuerpo de RRas2, la membrana se volvió a incubar con anticuerpo anti-PanRas, que reconoce tanto RRas2 como las Ras clásicas.

Considerando los resultados presentados en este estudio, proponemos un mecanismo de regulación de la proliferación y supervivencia de las células B de CG por parte de RRas2 basado en su reclutamiento directo al BCR y al CD40 y en la activación de las vías de PI3K y NFκB.

5. RRas2 controla la función mitocondrial de los centros germinales

Los datos presentados hasta este punto sugerían que RRas2 tiene un papel fundamental en la transducción de señales de las células B de CG que es importante para la dinámica que éstas experimentan dentro de la estructura de los centros germinales entre la zona clara y zona oscura. El grupo de Michel Nussenzweig ha descrito que las células B de CG experimentan un cambio en el patrón de expresión de un conjunto de genes clave que son responsables de la transición entre zona clara y oscura del centro germinal (Victoria et al., 2010). Siguiendo esta línea, nos planteamos si RRas2 podría estar mediando la expresión de algunos de estos genes clave, y que en última instancia fuera responsable de todo el defecto observado en el correcto desarrollo de la reacción de los centros germinales. Para abordar esta cuestión, en primer lugar purificamos células B de CG procedentes de ratones WT y *RRAS2*^{-/-}

inmunizados con SRBC tras 7 días mediante citometría de flujo. Extrajimos el ARN mensajero de dichas células para analizar el patrón de expresión génica de esta población con un panel MouseGene 2.0 (Affimetrix). Los resultados obtenidos mostraron una asombrosa equiparación en el patrón de expresión génica de las células B de CG de WT y de ratones *RRAS2*^{-/-} (Figura 24 A). No obstante, de la reducida lista de genes que están diferencialmente expresados entre los dos genotipos encontramos varios genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt) codificados por la mitocondria (Figura 24 A, derecha). Los ARNt son moléculas adaptadoras compuestas de ARN que sirven como puente físico entre el ARN mensajero y la secuencia de aminoácidos de la que se componen las proteínas. Esta tarea pueden realizarla gracias a que los ARNt transportan un aminoácido hacia la maquinaria de síntesis proteica del ribosoma dirigida por una secuencia de ARN de 3 nucleótidos (codón) que es complementaria con el ARN mensajero. Por tanto, los ARNt son una parte fundamental de la traducción, esto es, de la síntesis de nuevas proteínas a partir del código genético. Cada molécula de ARNt transporta únicamente un aminoácido.

De los aproximadamente 500 ARNt que operan en las células eucariotas, 22 de ellos están codificados por el ADN mitocondrial (ADNmt). Estos 22 ARNt están relacionados con la traducción de las subunidades de las que se compone el complejo mitocondrial responsable de la fosforilación oxidativa. Los genes mitocondriales que codifican para los diferentes ARNt son especialmente susceptibles de sufrir mutaciones puntuales que causan disfunciones mitocondriales relacionadas con diversas patologías (Suzuki et al., 2011). Los ARNt mitocondriales que están significativamente menos expresados en ausencia de *RRas2* son ARNt_Arginina, ARNt_Serina2, ARNt_Leucina2, y ARNt_Fenilalanina (Figura 24 A, derecha).

Motivados por estos resultados, decidimos realizar una serie de experimentos dirigidos a estudiar más en profundidad la función mitocondrial de las células B de los ratones *RRAS2*^{-/-}.

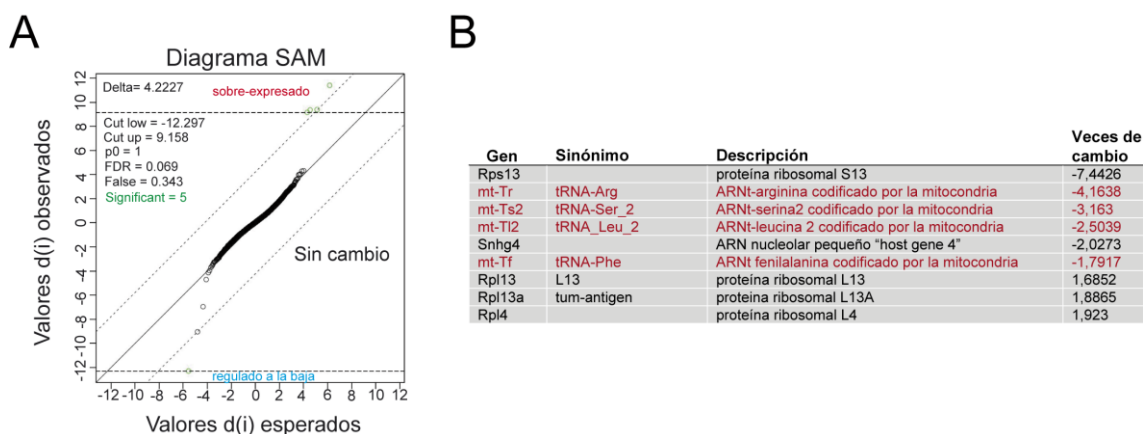


Figura 24. Las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} presentan diferencias significativas en la expresión de ARNt mitocondriales.

(A) Diagrama de significatividad de microarrays (SAM) donde se representan los genes diferencialmente expresados entre las células B de CG de ratones WT y *RRAS2*^{-/-}. Todos los genes que se representan a lo largo de la diagonal son genes que no presentan diferencias de expresión significativas, de manera que la gran mayoría de los genes analizados no presentan un perfil diferencial entre el grupo WT y el deficiente en *RRas2*.

(B) Tabla con la lista de los genes que presentan una expresión diferencial entre las células B de CG WT o *RRAS2*^{-/-}. Los ARNt mitocondriales se indican en rojo.

5.1. Las células B carentes de *RRas2* contienen más mitocondrias

En una primera aproximación, quisimos estudiar la cantidad y la funcionalidad de las mitocondrias en ausencia de *RRas2*. Para ello, nos valimos de las sondas mitocondriales o “mitotrackers”. Estas sondas difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se acumulan en las mitocondrias activas. Esto se consigue gracias a que cuando la sonda experimenta una reacción de oxidación que la vuelve fluorescente (REF). Además, se acumulan en la matriz mitocondrial debido a la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana interna. Por tanto, se puede considerar que los mitotrackers sirven como una medida de la funcionalidad de las mitocondrias en tanto que miden el potencial de las mismas. No obstante, el mitotracker de color verde presenta una peculiaridad que es que su acumulación en las mitocondrias es independiente de potencial. De esta forma, mientras que la mayoría de mitotrackers sirven para medir el potencial de las mitocondrias (y por tanto la funcionalidad de las mismas), el mitotracker verde puede usarse como medida de la masa mitocondrial. De hecho, se ha descrito que el uso del mitotracker verde en combinación con otros mitotrackers es capaz de distinguir poblaciones B en función del destino celular que van a adquirir (REF). Basándonos en estas premisas, extrajimos células B de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} e incubamos con mitotracker rojo y verde tras estimular las células con anti-IgM durante 24 horas. Nuestros resultados mostraron que las células carentes de *RRas2* contienen más masa mitocondrial tanto en condiciones basales como estimuladas (Figura 25A y B). En cambio, el potencial mitocondrial, si bien también es algo mayor en las células B *RRAS2*^{-/-} en comparación con las WT, la

diferencia no es tan acusada como en el caso de la masa mitocondrial (Figura 25B). Estos datos apuntan a la idea de que puede existir un defecto funcional en las mitocondrias de las células B carentes de *RRas2* que se intenta compensar generando más mitocondrias.

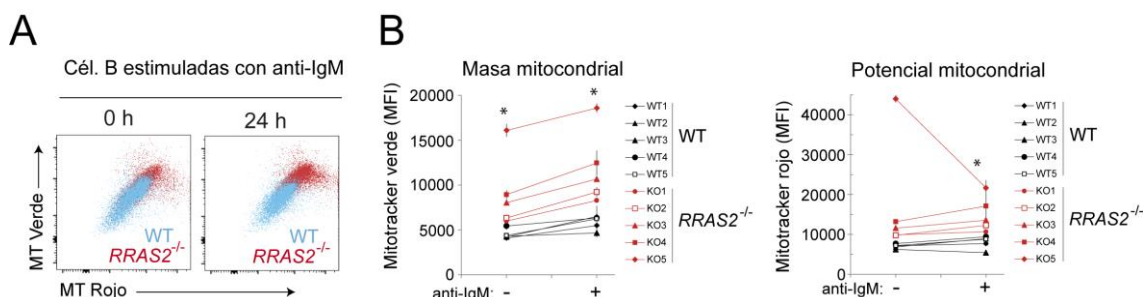


Figura 25. Las células B deficientes en *RRas2* contienen más mitocondrias pero son menos funcionales.

(A) Diagrama representativo de citometría de flujo en donde se muestra la tinción con los mitotrackers verde (MT verde, eje y) y rojo (MT rojo, eje x) en condiciones basales o estimulados durante 24 horas con anti-IgM. En color azul se muestra la tinción de las células B WT en superposición con las células B *RRAS2*^{-/-} en rojo.

(B) Gráficos del mitotracker rojo y mitotracker verde por separado de todos los ratones representados individualmente (n = 5 ratones por grupo).

5.2. Las células B de centro germinal deficientes en *RRas2* tienen más mitocondrias pero son menos funcionales

Siguiendo la línea de los experimentos anteriores, nos propusimos estudiar la funcionalidad mitocondrial específicamente en la población de centro germinal de los ratones *RRAS2*^{-/-}. Para ello, incubamos células de bazo de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} con los mitotrackers verde y rojo a los 7 días de inmunizar con SRBC y los analizamos por citometría de flujo. Asimismo, utilizando marcadores de superficie para células B y células T pudimos comparar los datos de masa y potencial mitocondrial en células B totales, células B de centro germinal y células T con el objetivo de analizar si las diferencias encontradas eran específicas de la población de centro germinal o afectaban también a otros tipos celulares (Figura 26A). Nuestros resultados mostraron que las células B de CG de ratones *RRAS2*^{-/-} tienen significativamente más masa mitocondrial que las de ratones WT (Figura 26B). Sin embargo, tanto las células B que no expresan marcadores de centro germinal como las células T no mostraron diferencias significativas. El potencial de membrana mitocondrial no mostró diferencias significativas en ninguna de las poblaciones (Figura 26B). Sin embargo, al hacer el cociente entre la masa y el potencial encontramos diferencias significativas en la población de centro germinal (Figura 26B, abajo). Estos resultados sugieren que las células deficientes en *RRas2* tienen un defecto en el metabolismo mitocondrial a pesar de tener más mitocondrias.

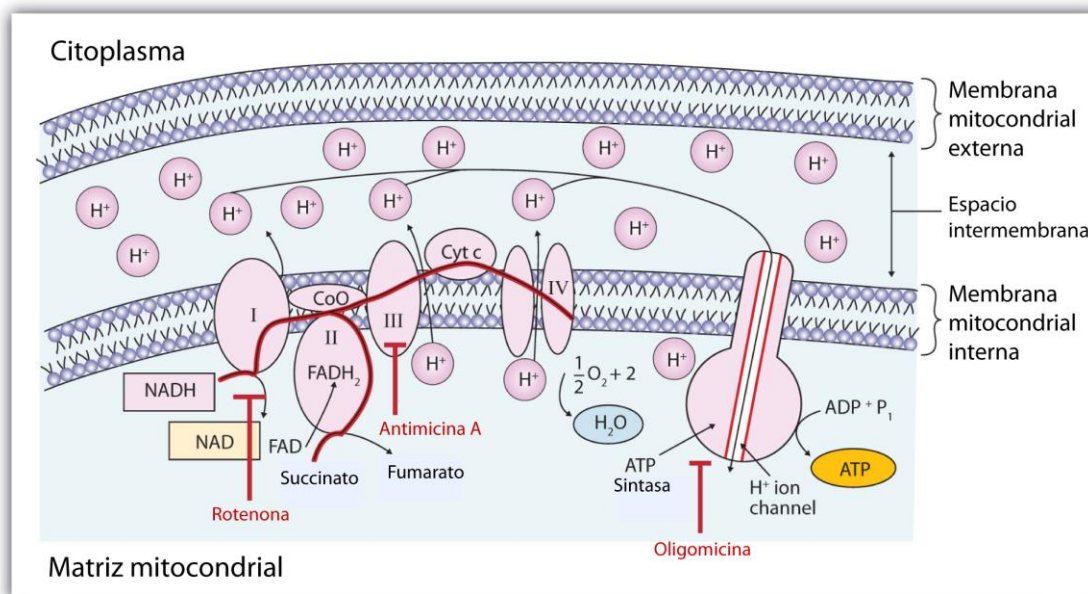


Ilustración 8. Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial y los inhibidores utilizados en este estudio.

Los componentes de la cadena se organizan en cinco complejos: el complejo I, II, III, y IV, y la ATP-sintasa. Cada complejo está formado por varias enzimas, otras proteínas e iones. Estos iones pueden reducirse y oxidarse repetidamente a medida que los electrones pasan de un componente al siguiente. A medida que los electrones son transportados a lo largo de la cadena, los iones de hidrógeno se translocan desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente de protones. Cuando la célula necesita suministro de ATP, este gradiente se disipa a través del transporte de protones por el canal de la ATP-sintasa, lo que le proporciona a la misma la energía para generar ATP a partir de ADP + P_i. El complejo I tiene 7 proteínas codificadas por el ADN mitocondrial, el complejo III tiene 1, el complejo IV tiene 3 y la ATP-sintasa tiene 2.

Usando un analizador XF (Seahorse Bioscience) puede medirse en tiempo real la tasa de consumo de oxígeno y la tasa de acidificación extracelular (de las siglas en inglés OCR y ECAR respectivamente) que son indicadores de la respiración mitocondrial y de la glicólisis respectivamente. Con estas medidas pueden calcularse parámetros como la respiración basal, el escape de protones, la producción de ATP, la capacidad respiratoria máxima, la respiración no mitocondrial y la capacidad de reserva tal y como se muestra en el esquema de Ilustración 9.

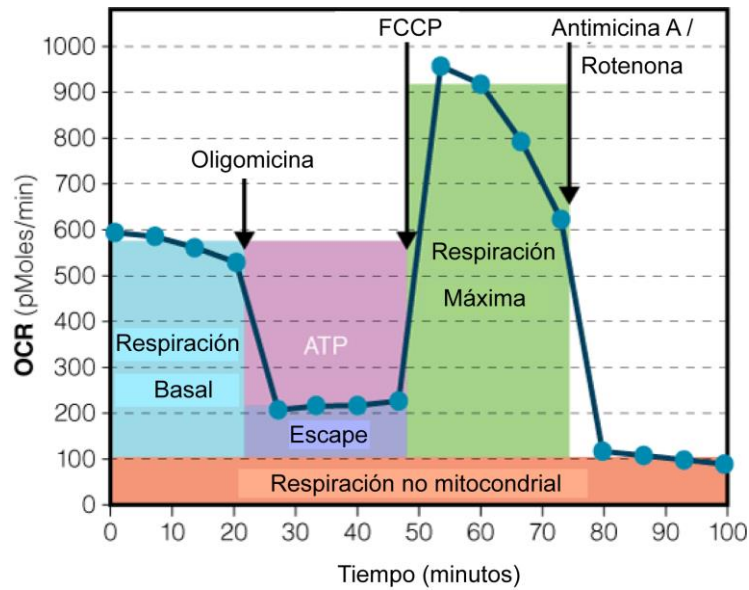


Ilustración 9. Esquema de los parámetros metabólicos que se pueden medir a través de la tasa de consumo de oxígeno con el analizador XF (Seahorse Bioscience).

El analizador XF mide en tiempo real la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en respuesta a distintos tratamientos. Las cuatro primeras medidas son del OCR basal; después se añade la oligomicina (inhibidor de la ATP-sintasa) tras lo cual se puede calcular el escape de protones; el FCCP activa la respiración máxima al romper el gradiente de protones del espacio intermembrana; y por último la rotenona y la antimicina A (inhibidores de los complejos I y III) bloquean la respiración mitocondrial, por lo que revela la cantidad de respiración debida a otros procesos no mitocondriales.

Las células B estimuladas con anti-IgM durante 24 horas experimentan un aumento tanto de la respiración mitocondrial como de la glicolisis medida por esta técnica (Capasso et al., 2010). Para ver si la respiración mitocondrial y / o la glicolisis estaba alterada en ausencia de *RRas2*, purificamos células B de bazo de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} y las estimulamos con anti-IgM durante 24 horas antes de realizar las mediciones respectivas con el analizador XF. Nuestros datos muestran que las células *RRAS2*^{-/-} no son capaces de aumentar la respiración basal en respuesta al estímulo del BCR como lo hacen las células WT (Figura 27A, barras azules). El uso de oligomicina inhibe la ATP-sintasa (Ilustración 8), pero el consumo de oxígeno continúa debido a otras actividades diferentes a la síntesis de ATP mitocondrial por el llamado escape de protones y por la respiración no mitocondrial. La diferencia entre el consumo basal y el escape de protones (representado en la barra gris de la Figura 27A) constituye la respiración mitocondrial utilizada en la síntesis de ATP. Nuestros resultados indican que la respiración mitocondrial empleada en la producción de ATP se encuentra disminuida en ausencia de *RRas2* (ver la diferencia entre las barras azul y gris de la Figura 27A). El uso del ionóforo FCCP rompe el gradiente de protones. No obstante, la mitocondria sigue bombeando protones para intentar compensar esto, dando lugar a la respiración máxima. Por tanto, el consumo de oxígeno medido en estas condiciones indican la capacidad de reserva mitocondrial. Nuestros experimentos revelan que la capacidad de

reserva de las mitocondrias de células deficientes en *RRas2* en reposo es menor que la de las WT, y además no aumenta en respuesta a la estimulación con anti-IgM, como lo hace en las mitocondrias control (Figura 27A, barra roja). Por último, el consumo de oxígeno medido tras la adición de antimicina A y rotenona, ambos inhibidores de los complejos I y II respectivamente, indican el dato de respiración no mitocondrial. Mientras que este tipo de respiración se ve incrementada tras la estimulación del BCR en la condición WT, no ocurre lo mismo con las células B *RRAS2*^{-/-} (Figura 27A barra verde).

Por otro lado, dado que los datos de respiración anticipan un defecto metabólico asociado a las mitocondrias, nos preguntamos si las células podrían estar intentando compensar esta deficiencia a través de aumentar la glicolisis. Esto puede medirse a través de la acidificación extracelular (ECAR) puesto que la glucólisis no aeróbica lleva aparejada la producción de ácido láctico. No obstante, las células B deficientes en *RRas2* tienen niveles de glicolisis por debajo del WT tanto en condiciones basales como estimuladas. Por tanto, en ausencia de *RRas2* las células B se encuentran al límite de su capacidad catabólica mitocondrial y son incapaces de compensarla a través de la glicolisis anaeróbica. En suma, todos estos datos indican que *RRas2* es una molécula fundamental para la actividad metabólica de las células B, y que los linfocitos B carentes de *RRas2* no pueden adaptarse al aumento de la demanda energética producida tras la activación como es el caso de la reacción del centro germinal.

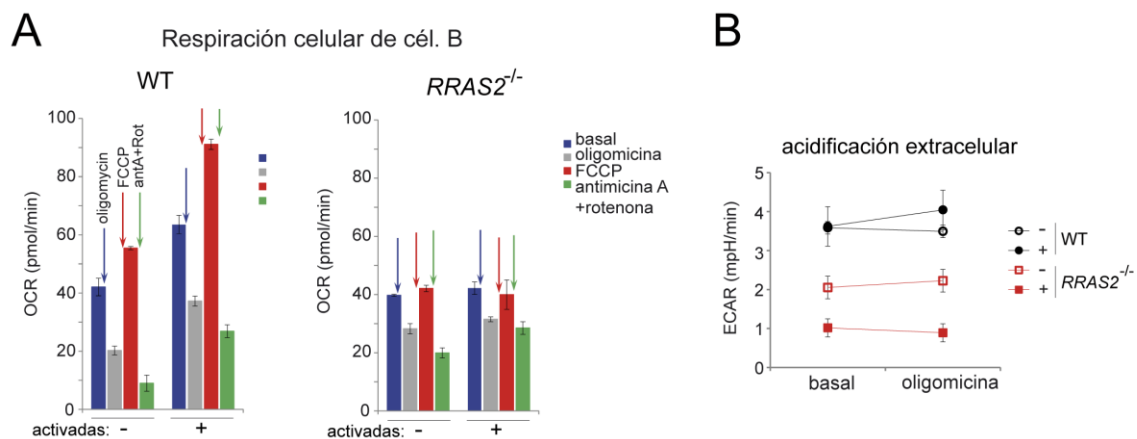


Figura 27. Las células B carentes de *RRas2* están al límite de una crisis energética.

(A) Gráfico de barras que muestra la tasa de consumo de oxígeno basal (barra azul), tras añadir oligomycin (barra gris), tras añadir FCCP (barra roja) y tras añadir una mezcla de antimicina A y rotenona (barra verde) de células B aisladas de ratones WT o *RRAS2*^{-/-} en condiciones basales o estimuladas durante 24 horas con anti-IgM.

(B) Gráfico de acidificación extracelular (ECAR) que representa los datos de glicolisis de cada uno de los grupos indicados en (A). Los gráficos son representativos de 3 experimentos independientes con medidas quintuplicadas de un conjunto de n = 3 ratones por grupo.

5.4. Las células B deficientes en RRas2 tienen niveles disminuidos de ATP5D

Puesto que las células B deficientes en RRas2 tienen un defecto en la capacidad respiratoria, y dado que el análisis de expresión génica por microarrays señalaba que existe una disminución en la expresión de ARN de transferencia (ARNt) codificados por el ADN mitocondrial, nuestra siguiente pregunta fue si el defecto observado podría deberse a una menor expresión de proteínas implicadas en la función mitocondrial. Para abordar esta cuestión, realizamos inmunoblots para detectar proteínas codificadas por el ADN mitocondrial. En particular, nos centramos en las subunidades del complejo V o ATP-sintasa dado que se ha descrito que algunas de estas subunidades están reguladas por la vía de PI3K/mTOR, lo que establecería un vínculo directo entre RRas2 y el metabolismo mitocondrial (Morita et al., 2013). Nuestros resultados muestran que las células B procedentes de ratones *RRAS2*^{-/-} tienen menores niveles de la subunidad ATP-5D, una de las componentes fundamentales de la ATP-sintasa (Figura 28).

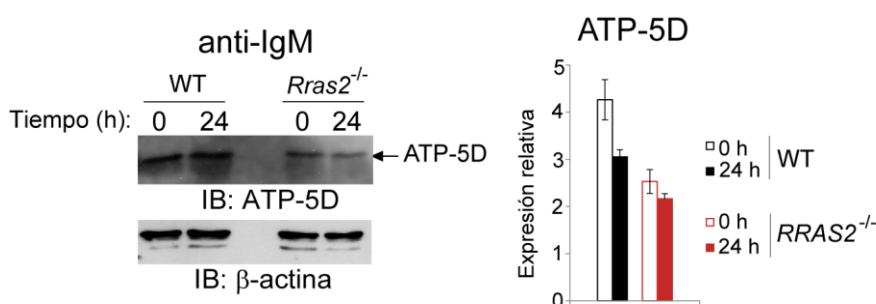


Figura 28. Los linfocitos B *RRAS2*^{-/-} expresan menos ATP-5D

WB que muestra los niveles de proteína de la subunidad ATP-5D de extractos de proteína total de linfocitos B purificados de bazo de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} en condiciones basales y estimulados durante 24 horas con anti-IgM. A la derecha se muestra el gráfico de barras con la cuantificación de tres experimentos independientes.

Tras comprobar que existe una disminución en los niveles de proteína de la ATP-5D, nos faltaba saber el mecanismo molecular a través del cual RRas2 está regulando la expresión de esta proteína. Puesto que se ha demostrado que el complejo mTORC1 controla la síntesis de varias proteínas codificadas por el ADN mitocondrial, entre ellas precisamente ATP-5D (Morita et al., 2013), y mTORC1 es a su vez uno de los complejos efectores de la vía PI3K/Akt, nuestra hipótesis es que RRas2 regula la síntesis de proteínas mitocondriales a través de la regulación de mTOR. Para abordar esta cuestión, en primer lugar analizamos los niveles de fosforilación de mTOR con el objetivo de ver si en ausencia de RRas2 mTOR se encuentra menos activado. Lamentablemente, los anticuerpos de mTOR y de fosfo-mTOR no detectan de forma específica la proteína en nuestras muestras. Para solventar este problema y poder evaluar de forma indirecta la actividad de mTOR, hicimos inmunoblots para detectar la fosforilación de p70S6K, una de las dianas del complejo mTORC1. Los resultados indican que en ausencia de RRas2 los niveles de la quinasa p70S6K fosforilada están disminuidos, lo que sugiere un

defecto funcional de mTORC1 (Figura 29). Estos datos apuntan a la vía de mTOR como una firme candidata a estar mediando la regulación metabólica de los linfocitos B de CG a través de RRas2.

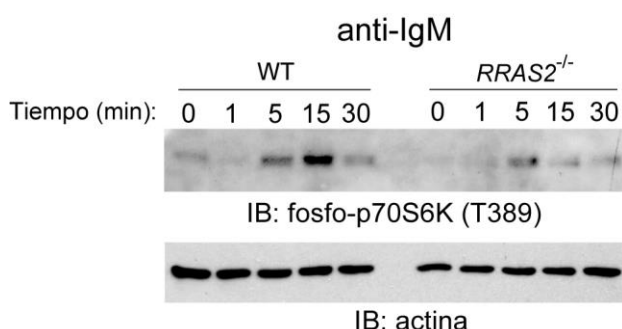


Figura 29. Los niveles de p70S6K fosforilados están disminuidos en ausencia de RRas2. Immunoblot que muestra los niveles de fosforilación de p70S6K en respuesta al estímulo con anti-IgM a los tiempos indicados.

6. RRas2 se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de linfomas humanos

Hemos concluido que RRas2 es un elemento esencial en la formación de centros germinales. Como se ha mencionado en la Introducción, los centros germinales son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa, pero a su vez constituyen el principal origen de la mayoría de los linfomas de tipo B, y por tanto de la mayoría de linfomas en general. De hecho, RRas2 es el único miembro de la familia R-Ras que se ha relacionado con procesos tumorigénicos (Graham et al., 1994). Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar si RRas2 podría desempeñar algún papel pro-oncogénico en procesos tumorales, especialmente los derivados de centros germinales.

Nos planteamos si los niveles de expresión de RRas2 podrían estar aumentados en distintos tipos de linfomas humanos. Para ello, analizamos mediante PCR cuantitativa la expresión de RRas2 en un panel comercial conteniendo ADN complementario procedente de 42 muestras de pacientes de linfomas y 6 muestras de tejidos normales (TissueScan Lymphoma qPCR Panel I, OriGene). Nuestros objetivos eran: por un lado comprobar si RRas2 se encontraba sobreexpresado en muestras de pacientes con linfomas, y por otro lado, analizar si esa sobreexpresión se podía correlacionar con un tipo de leucemia o linfoma en concreto. Los resultados muestran una sobreexpresión de RRas2 en 23 de los 42 casos de linfomas analizados, siendo particularmente alta en casos de linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes

(DLBCL), linfoma de zona marginal extranodal o linfoma MALT y linfoma de zona marginal nodal (Figura 30). Este dato sugiere la posibilidad de que RRas2 podría estar desempeñando un papel pro-tumoral en esos casos. Sin embargo, a pesar de esto no pudimos correlacionar ninguno de los linfomas analizados con los niveles de RRas2.

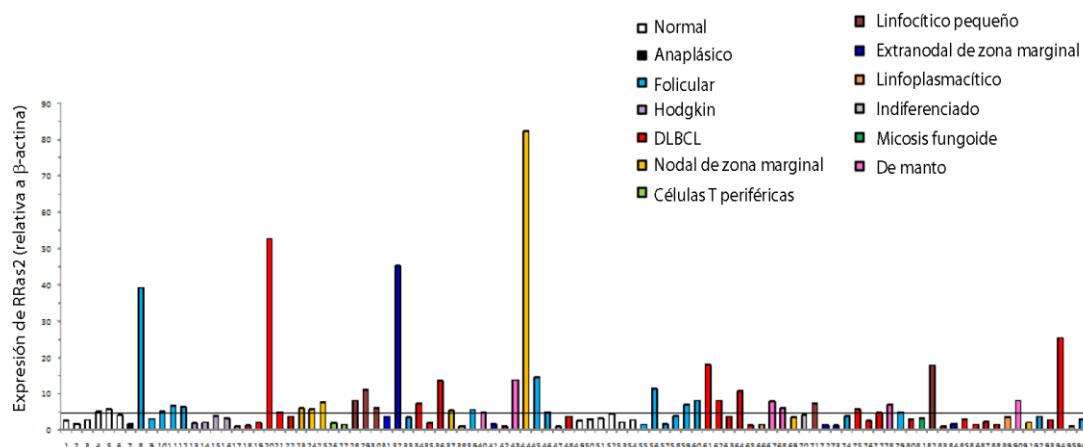


Figura 30. RRas2 se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de linfomas humanos. Niveles de expresión de RRas2 normalizados con la expresión de β -actina en las 48 muestras del panel de ADN complementario de linfomas de OriGene.

7. RRas2 desempeña un papel pro-tumoral en la formación de linfomas de ratón

Dado que RRas2 se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de linfomas humanos, a continuación quisimos estudiar en modelos experimentales de ratón el efecto de RRas2 en la formación de tumores. Para determinar el papel de RRas2 en la formación de tumores, cruzamos los ratones *RRAS2*^{-/-} con ratones deficientes en el supresor tumoral p53 (ratones *Trp53*^{-/-}), y en segundo lugar los ratones *Eμ-myc*.

Los ratones *Trp53*^{-/-} albergan una mutación en el gen de p53 que provoca una eliminación completa de esta proteína (Jacks et al., 1994, Donehower et al., 1992). Estos ratones presentan una tendencia a desarrollar lesiones malignas de forma espontánea. De hecho, el 100% de los ratones *Trp53*^{-/-} mueren entre los 3 y 6 meses de edad como consecuencia de la formación de tumores cuyo espectro puede variar en función del fondo genético o cepa de estudio. De manera global, los linfomas y los sarcomas representan la mayoría de los tumores encontrados en ratones *Trp53*^{-/-}, seguidos por tumores testiculares, osteosarcomas, y finalmente otros tipos de cáncer (Jacks et al., 1994).

Los ratones *Eμ-myc* tienen la secuencia del proto-oncogén *c-myc* a continuación del enhancer de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*Eμ*) (Adams et al., 1985). Esta translocación se encuentra de manera natural en multitud de tumores linfoides como por ejemplo el linfoma de Burkitt humano o muchos plasmacitomas de ratón, uno de los cuales ha generado precisamente la línea de la que se aisló la construcción para generar este modelo transgénico (Corcoran et al., 1985). Los ratones que albergan esta construcción sobreexpresan el gen *c-myc* específicamente en células B, lo que hace que éstas proliferen a una tasa mayor de lo normal. Como resultado, todos los tumores que desarrollan estos ratones son linfomas malignos de tipo B, normalmente acompañados de leucemias (Harris et al., 1988). En consecuencia, el 100% de estos animales acaban muriendo antes de los 3 meses de edad.

7.1. La deficiencia en *RRas2* retrasa la mortalidad de los ratones deficientes en el supresor tumoral p53

Para analizar el posible efecto de la ausencia *RRas2* en la formación de tumores espontáneos, cruzamos ratones *RRAS2*^{-/-} con los *Trp53*^{-/-} y estudiamos tres líneas en paralelo: ratones con las dos copias silvestres de *RRas2* (*Trp53*^{-/-}), ratones con sólo una copia de *RRas2* (*Trp53*^{-/-};*RRAS2*^{+/-}), y ratones dobles deficientes en *RRas2* y en p53 (*Trp53*^{-/-};*RRAS2*^{-/-}). En todos los casos monitorizamos los ratones observándoles y palpándoles todas las semanas al menos una vez, tal y como se indica en el apartado de Métodos 8.13. En los casos en los que detectamos por palpación una masa tumoral, hicimos un seguimiento de la progresión del mismo hasta que el tumor adquiría un tamaño de más de 2 cm de diámetro o se acompañaba de síntomas de enfermedad incompatibles con la vida del animal según los criterios de punto final, momento en el que se sacrificaba el ratón y se procedía a realizar la necropsia. A lo largo del estudio, no encontramos una mejora en la supervivencia global de los ratones *Trp53*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} en comparación con los ratones *Trp53*^{-/-};*RRAS2*^{+/-}, o con los *Trp53*^{-/-} siendo la supervivencia media de los animales 27,7; 25,4; y 28 semanas respectivamente y la vida máxima no superaba en ningún caso los 10 meses de edad. No obstante, durante las primeras 25 semanas, sí que observamos que los ratones *Trp53*^{-/-};*RRAS2*^{-/-} presentaban un retraso en la mortalidad y en la manifestación de los primeros síntomas de enfermedad. Durante las primeras 25 semanas de edad encontramos una diferencia significativa en la supervivencia media entre los ratones dobles deficientes en *RRas2* y p53 y los deficientes en p53. Estos datos sugieren que la ausencia de *RRas2* no es suficiente para proteger a los ratones *Trp53*^{-/-} de la formación de lesiones malignas de forma global pero sí es capaz de retrasar los procesos tumorigénicos mejorando la supervivencia de los ratones en estadios tempranos.

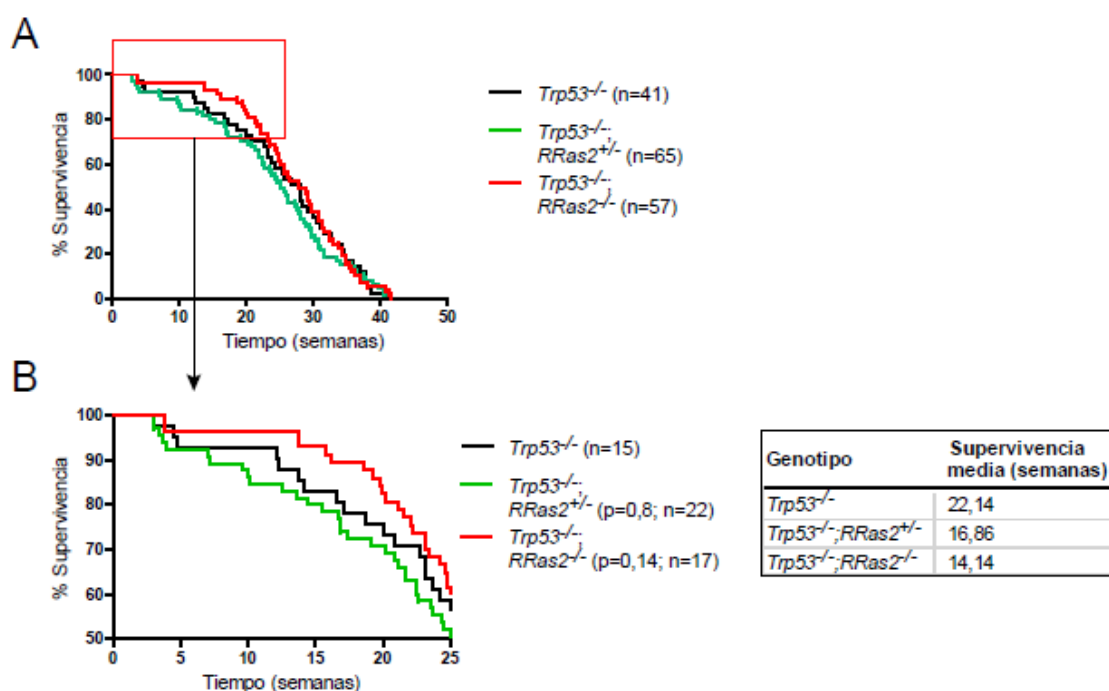


Figura 31. La ausencia de RRas2 retrasa la mortalidad de los ratones *Trp53*^{-/-}.

(A) Curva de Kaplan-Meier que representa la supervivencia de los ratones de los genotipos indicados. El número de ratones estudiados de cada grupo se indica en la leyenda.

(B) Curva de Kaplan-Meier que representa el periodo de las primeras 25 semanas de la curva mostrada en (A). Durante este periodo hay una mejora significativa en la supervivencia de los ratones *Trp53*^{-/-}; *RRas2*^{-/-} en comparación con los *Trp53*^{-/-}. Los datos de supervivencia media de cada uno de los grupos se muestran a la derecha.

7.2. La ausencia de RRas2 altera el espectro tumoral de los ratones *Trp53*^{-/-}

Puesto que la deficiencia de RRas2 es capaz de mejorar la supervivencia en etapas tempranas de los ratones *Trp53*^{-/-}, nos planteamos si esto podría ser debido a que los tumores que se desarrollan en ausencia de RRas2 fueran de una tipología diferente y/o menos agresivos. Para abordar esta cuestión, en los casos en los que pudimos realizar necropsia de los ratones enfermos, procedimos a disgregar el tejido tumoral y analizarlo mediante citometría de flujo utilizando una gama de anticuerpos que nos permitieran hacer un diagnóstico de la neoplasia. En los casos en los que encontramos masas tumorales sólidas, utilizamos un criterio diagnóstico basado en los marcadores de superficie que expresaban las células tumorales de acuerdo con lo indicado en la Tabla 7. En el caso de que la neoplasia se manifestara a través de una esplenomegalia o de una hiperplasia de los ganglios linfáticos, establecimos el diagnóstico tomando como referencia el porcentaje normal que ha de representar cada una de las poblaciones linfoides en estos órganos, tal y como se muestra en la Tabla 8. Siguiendo este criterio, hemos diagnosticado un linfoma B cuando las células B representaban más del 65% de las células totales del bazo, o del 30% de las células de los ganglios; hemos diagnosticado un linfoma T cuando había más de un 40% de células

T en el bazo o más del 85% en los ganglios linfáticos; y hemos diagnosticado un tumor mieloide cuando había más de un 20% de células mieloides en el bazo o de un 10% en los ganglios.

Tipo de neoplasia	Fenotipo
Mieloide	CD11b ⁺
Linfoma T	H57 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ / H57 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ / H57 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻
Linfoma Pre/Pro B	B220 ⁺ IgM ⁻ IgD ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻
Linfoma B Inmaduro	B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻
Linfoma B Maduro	B220 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁺
No linfoide	CD11b ⁻ y ningún marcador linfoide

Tabla 7. Marcadores de las neoplasias encontradas en los ratones *Trp53*^{-/-}.

Se indican los principales marcadores que hemos utilizado para estudiar el fenotipo de las células tumorales.

Población celular	Porcentaje en bazo	Porcentaje en ganglio linfático
Células B (CD19 ⁺)	58±7 %	18±5 %
Células T (CD3 ⁺)	33±5 %	79±6 %
Células Mieloides (CD11b ⁺)	8±4 %	3±0,5 %

Tabla 8. Porcentajes normales de las poblaciones linfoides en bazo y ganglios linfáticos.

Se indican los porcentajes de células B, T y mieloides que se encuentran en bazo y ganglios linfáticos de ratones sanos.

Siguiendo el criterio de la Tabla 7 pudimos concluir que la distribución de los distintos tipos de neoplasias encontradas en los ratones *Trp53*^{-/-} cambia en función de si los animales presentan una deficiencia o no en el gen *RRas2*. Los ratones *Trp53*^{-/-}; *RRAS2*^{-/-} presentan una tendencia a desarrollar lesiones malignas de tipo no linfoide en comparación con los animales que tienen el gen silvestre de *RRAS2*, o con los que tienen sólo una copia del mismo (Tabla 9). Para confirmar este dato, los casos que no presentaban marcadores linfoides en el análisis por citometría de flujo fueron estudiados por un patólogo a partir de tinciones de hematoxilina / eosina de cortes histológicos (Figura 32).

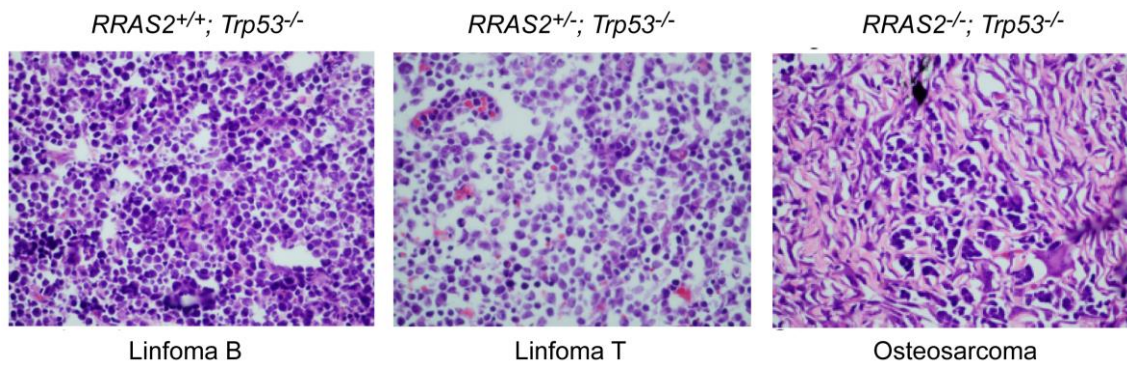


Figura 32. Muestras de histoquímica de tumores de ratones *Trp53*^{-/-}

Fotografías representativas de cortes histológicos de las masas tumorales encontradas en los ratones de los genotipos indicados. Debajo de cada foto se encuentra el diagnóstico según el análisis de citometría de flujo.

En la Figura 33 se muestra un resumen de los casos analizados distinguiendo entre neoplasia de tipo mieloide, linfoma T, linfoma B o tipo no linfoide (Figura 33A), o simplemente distinguiendo entre tumores de origen linfoide o no linfoide (Figura 33B). Nuestros resultados sugieren que *RRas2* juega un papel importante en la formación de neoplasias de origen linfoide, pero no en la formación de sarcomas y otros tipos de tumores. El ligero retraso en la mortalidad observado a las primeras 25 semanas podría deberse a que los ratones *RRAS2*^{-/-} no enferman por la aparición temprana de tumores linfoides, peor lo hacen un poco más tarde por la aparición de tumores no dependientes de *RRas2*. Otro aspecto interesante es que los ratones heterocigotos *RRAS2*^{+/-} tienen mayor propensión a desarrollar linfomas T que los *RRAS2*^{+/+} y *RRAS2*^{-/-}.

Genotipo	ID	Edad (semanas)	Localización	Diagnóstico FC	Diagnóstico histopatológico
<i>Trp53</i> ^{-/-} ; <i>RRAS2</i> ^{+/+}	164	23	Ganglio axilar	Mieloide	
	149	23	Bazo, hígado	No linfoide	Tumor fibroso
	168	24	Ganglios linfáticos, intestino	Linfoma B maduro	
	9	38	Ganglios linfáticos, bazo	Linfoma T	
	77	14	Masa sólida en tórax	No linfoide	Tumor estirpe adiposa
	35	35	Ganglio axilar	Mieloide	
	88	25	Tumor mesentérico	No linfoide	Tumor de células pequeñas cuello
	76	37	Ganglios y bazo	Linfoma B maduro	
	8	26	Tumor intestinal	No linfoide	Sarcoma
<i>Trp53</i> ^{-/-} ; <i>RRAS2</i> ^{+/-}	51	14	Tumor en tórax	No linfoide	Lesión mesenquimal
	13	24	Ganglio submaxilar, hígado	Linfoma T	
	166	41	Ganglio mesentérico, bazo	Linfoma Pre/Pro B	
	48	30	Bazo, hígado	Linfoma T	
	50	31	Ganglio axilar, y bazo	Linfoma B inmaduro	
	90	23	Masa sólida en peritoneo	Mieloide	
	67	40	Ganglio cervical	Linfoma B maduro	
	87	39	Bazo	Linfoma T	
	93	29	Bazo, parálisis	Mieloide	
	10	21	Ganglios linfáticos, timo	Linfoma T	
	3	34	Tumor mesentérico	Linfoma T	
	13	31	Ganglio axilar	Mieloide	
<i>Trp53</i> ^{-/-} ; <i>RRAS2</i> ^{-/-}	129	31	Ganglios linfáticos, bazo	Linfoma B inmaduro	
	131	31	Bazo	Linfoma B maduro	
	125	74	Ganglio cervical y bazo	No linfoide	Lesión benigna
	23	30	Bazo	No linfoide	Tumor fibroso
	64	23	Tumor sólido en estómago	No linfoide	Liposarcoma
	22	37	Ganglio linfáticos bazo	No linfoide	Lesión mesenquimal
	62	26	Masa sólida en peritoneo, bazo	No linfoide	Liposarcoma pleiomórfico
	60	34	Bazo e hígado	No linfoide	Infiltrado no tumoral
	61	36	Ganglios, masa en intestino	Mieloide	
	81	36	Tumor intestinal	No linfoide	Sarcoma
	86	32	Tumor en tórax	No linfoide	Sarcoma
	7	25	Osteosarcoma (Parálisis)	No linfoide	Osteosarcoma
	31	35	Parálisis, tumor mesentérico	Linfoma Pre/Pro B	
	38	35	Parálisis	No linfoide	Osteosarcoma

Tabla 9. Fenotipo de los tumores encontrados en el modelo *Trp53*^{-/-}.

Resumen de los diagnósticos de los distintos tumores encontrados en el modelo *Trp53*^{-/-}. Se indica el genotipo de cada grupo, el número de identificación, la edad de los ratones en semanas, la localización de las masas tumorales encontradas, el fenotipo por citometría de flujo (FC) en función de los criterios explicados en la Tabla 7, y en el caso de los tumores no linfoides, la confirmación diagnóstica realizada por un patólogo con tinciones de hematoxilina/eosina de los cortes histológicos.

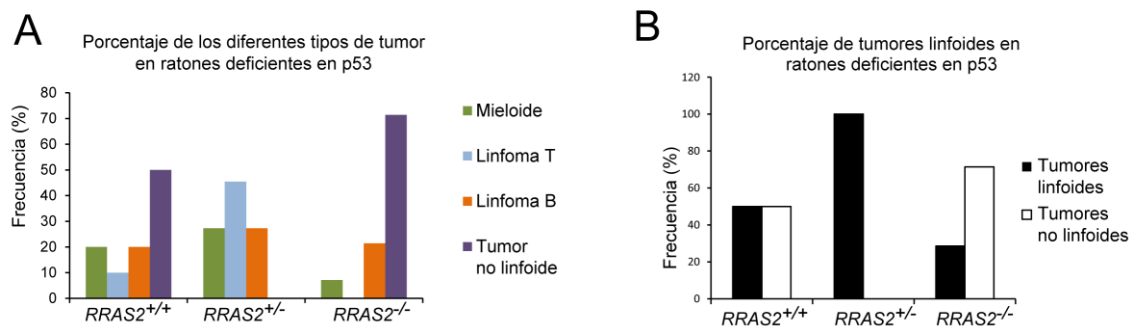


Figura 33. Gráfico resumen del espectro de tumores encontrado en ratones deficientes en p53.

(A) Se muestra el gráfico de barras con el resumen de los distintos tipos de tumores encontrados en los ratones con distintas dosis de RRas2 en un contexto de deficiencia en p53. (B) Se muestra el mismo resumen que en (A) distinguiendo sólo entre neoplasias de origen linfoide y no linfoides.

7.3. La ausencia de RRas2 acelera la mortalidad de los ratones *Eμ-myc*

Puesto que los resultados obtenidos en el modelo *Trp53*^{-/-} sugieren que RRas2 participa específicamente en el desarrollo de tumores de origen linfoide, y puesto que RRas2 media la supervivencia y homeostasis de las células B, quisimos estudiar el efecto de la ausencia de RRas2 en un modelo de cáncer específico de linfomas de tipo B. Para ello utilizamos el modelo *Eμ-myc* explicado al principio de este apartado. Siguiendo la misma estrategia que para los ratones *Trp53*^{-/-}, nuestro primer objetivo fue analizar la supervivencia global de estos ratones en presencia o ausencia de RRas2. Puesto que nuestros datos apuntan a que RRas2 puede desempeñar una función oncogénica en determinados contextos, nuestra hipótesis inicial era comprobar si RRas2 también era capaz de retrasar la mortalidad de los ratones *Eμ-myc* de un modo similar a lo observado en el caso de los ratones deficientes en p53. No obstante, las curvas de supervivencia indican que los ratones *Eμ-myc* que albergan sólo una copia de RRas2 o ninguna mueren más rápidamente que los ratones que tienen la versión silvestre de esta proteína (Figura 34).

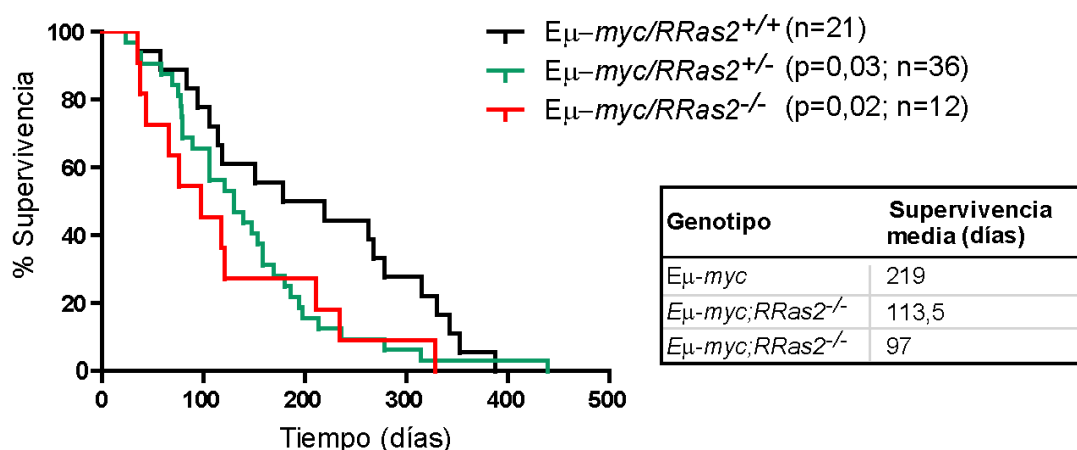


Figura 34. La ausencia de *RRas2* acelera la mortalidad de ratones *Eμ-myc*.

Curva de Kaplan-Meier que representa la supervivencia de los ratones *Eμ-myc* con distintas dosis del gen *RRas2*. La supervivencia media de cada grupo de ratones (en días) se muestra en la tabla de la derecha.

7.4. La ausencia de *RRas2* modifica el espectro tumoral de los ratones *Eμ-myc*

Nuestros datos supervivencia indican que la falta de una o de dos dosis de *RRas2* empeora la supervivencia de los ratones *Eμ-myc*. Por tanto, nos preguntamos si estos resultados pudieran ser debidos a que los ratones $E\mu\text{-myc};RRAS2^{-/-}$ estuvieran desarrollando tumores más agresivos. Para ello, en los casos en que pudimos realizar la necropsia de los animales, analizamos los tejidos linfoides (generalmente bazo y ganglios linfáticos) por citometría de flujo para determinar el fenotipo de las células malignas, estableciendo como referencia los marcadores indicados en la Tabla 10. Debido a la rapidez con la que estos ratones mueren, el número de tumores que hemos podido analizar no permite extraer conclusiones definitivas, pero sí hemos observado una tendencia de los ratones $E\mu\text{-myc};RRAS2^{-/-}$ a desarrollar linfomas B de tipo de más inmaduro que los ratones *Eμ-myc* (Tabla 11). Si esto se confirmara, estos resultados serían consistentes con los datos de supervivencia de los ratones *Eμ-myc* en ausencia de *RRas2*, ya que las neoplasias derivadas de estadios más inmaduros de células B son en general más agresivos y ello explicaría la aceleración de la mortalidad en este grupo.

Tipo de linfoma B	Fenotipo
Linfoma Pre/Pro B	IgM ⁻ IgD ⁻ CD21 ⁺ CD23 ⁻ CD38 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁻
Linfoma B Inmaduro	IgM ⁺ IgD ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁻ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁺
Linfoma B Maduro	IgM ⁻ IgD ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁻ / IgM ⁻ IgD ⁺ CD21 ⁻ CD23 ⁻ CD38 ⁺

Tabla 10. Marcadores de las neoplasias encontradas en los ratones *Eμ-myc*.

Se indican los principales marcadores que hemos utilizado para estudiar el fenotipo de las células de tumores sólidos.

Genotipo	ID	Tipo de tumor	Edad (semanas)	Tejido anormal
<i>Eμ-myc</i> ; <i>RRas2^{+/+}</i>	56	B Maduro	49	Ganglio axilar, inguinal y cervical
	81	B Maduro	12	Masa en mediastino, ganglio axilar e inguinal
	47	B Maduro	22	Ganglio inguinal
	45	B Maduro	25	Ganglio axilar
	49	Pre B	56	Masa sólida mesentérica
	134	B Maduro	37	Bazo
<i>Eμ-myc</i> ; <i>RRas2^{+/-}</i>	71	Pro/Pre B	11	Ganglio axilar e inguinal
	182	B Maduro	17	Masa sólida en peritoneo
	37	B Maduro	58	Masa sólida mesentérica
	36	Pro B	8	Masa sólida en el intestino /ganglio cervical
	18	B Inmaduro	17	Timo
	19	B Inmaduro	17	Timo y ganglio cervical
	21	B Maduro	21	Timo, ganglio mesentérico/inguinal/axilar
<i>Eμ-myc</i> ; <i>RRas2^{-/-}</i>	154	Pro/Pre B	17	Timo
	153	Pro/Pre B	14	Timo
	151	B Maduro	9	Ganglio axilar, inguinal y cervical
	131	B Maduro	33	Masa sólida mesentérica
	178	B Inmaduro	17	Ganglio cervical y axilar
	43	Pro B	17	Bazo / ganglio inguinal y axilar

Tabla 11. Espectro de tumores encontrados en los animales.

Tabla donde se indica el genotipo de cada grupo de ratones estudiado, el número de identificación, el diagnóstico asignado en función de los criterios explicados en la Tabla 10, la edad de los ratones en semanas y las localizaciones de los tumores encontrados en cada uno de los casos.

8. *RRas2* juega un papel en la maduración de las células B

El hecho de que los ratones *Eμ-myc* presenten linfomas en diferentes estadios de maduración de las células B sugería la posibilidad de que haya una participación de *RRas2* en el desarrollo en médula ósea de las células B. Por tanto, nos preguntamos si alguna de las poblaciones progenitoras medulares de células B podría estar afectada en ausencia de *RRas2*.

Las células B se generan a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea antes de migrar a los órganos linfoides periféricos. Las células B completamente diferenciadas, conocidas como células plasmáticas, se generan en estos órganos linfoides secundarios a partir de la activación de las células B maduras, y regresan a la médula ósea. Antes de tomar la decisión de diferenciación hacia el linaje B, existen varios estadios de desarrollo desde las HSC donde las diferentes células progenitoras pueden dar lugar a los diferentes linajes que se generan aquí. De esta

forma, después de las HSC se generan en el siguiente orden los progenitores multipotentes (MPP), los progenitores linfoides multipotentes (LMPP), y los progenitores linfoides comunes (CLP) antes de comprometerse en el proceso de diferenciación definitiva hacia células B (Ilustración 10).

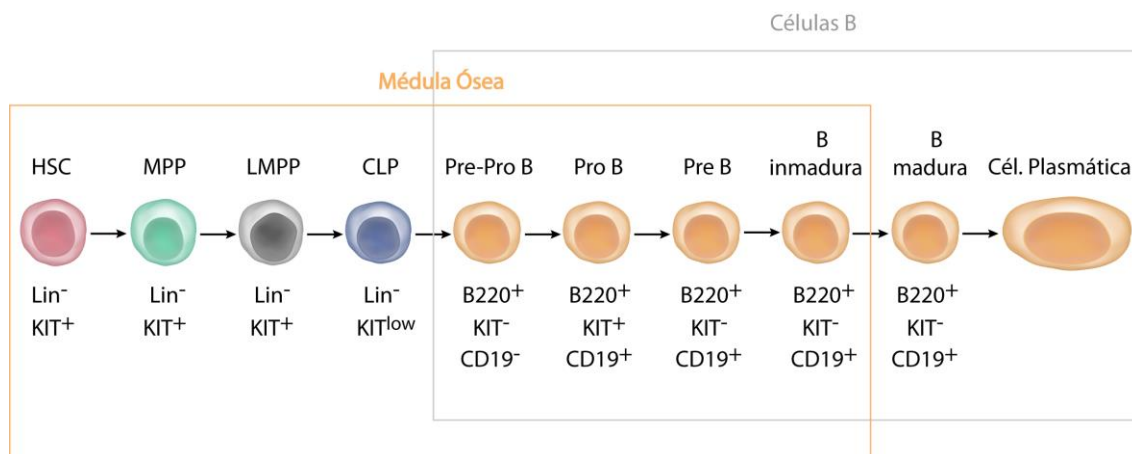


Ilustración 10. Esquema de maduración de las células B en la médula ósea

Diagrama con los diferentes estadios del desarrollo de las células B desde el progenitor de célula madre hematopoyética (HSC).

Los progenitores más tempranos de las células B se caracterizan por no tener expresión en membrana de inmunoglobulinas pero ser positivas para el marcador de linaje B B220. El estadio más temprano identificable de progenitores B se conoce como Pre-Pro B, el cual carece aún de reestructuraciones en los segmentos VDJ de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Por lo tanto, se considera que la maduración de los progenitores B más tempranos es independiente de la reestructuración de los genes de las inmunoglobulinas. El siguiente estadio es el estadio Pro-B, que consiste en células B mitóticamente muy activas y que ya presentan reorganizaciones del locus VDJ. A continuación, las células progresan hacia el estadio Pre-B, las cuales son mayoritariamente células en reposo; y finalmente las células B inmaduras, que expresan IgM pero carecen de IgD (revisado en Nagasawa, 2006). En este punto, las células B inmaduras abandonan la médula ósea y continúan su proceso de maduración en el bazo y órganos linfoides secundarios donde se convertirán en células maduras periféricas y células plasmáticas (Ilustración 10).

8.1. Las células de médula ósea de ratones *RRAS2*^{-/-} muestran un defecto en la transición entre los estadios de Pro-B a Pre-B de la maduración del linaje B

Para analizar si la ausencia de *RRas2* influye en la progresión del desarrollo de las células B, en primer lugar estudiamos las principales subpoblaciones B de la médula ósea de ratones WT y *RRAS2*^{-/-}. Las poblaciones de Pro-B y Pre-B, células B inmaduras, y células B maduras se pueden distinguir de acuerdo con la distribución de marcadores de

superficie IgM y B220. El análisis por citometría de flujo de estos marcadores reveló que existe una disminución en las poblaciones Pro-B + Pre-B e inmaduras en la médula ósea de ratones *RRAS2^{-/-}* (Figura 35A). Dentro del grupo Pro-B + Pre-B, podemos distinguir ambas subpoblaciones en base a los marcadores CD25 y cKIT, ya que las células Pro-B son cKIT⁺ CD25⁻ y las células Pre-B son cKIT⁻ CD25⁺. Cuando estudiamos estos marcadores, observamos que las células B deficientes en *RRas2* presentan un aumento en la población positiva para cKIT, indicando que estas células se acumulan en el estadio Pro-B causando un efecto “cuello de botella” en el proceso de maduración B (Figura 35B). Estos datos confirman que *RRas2* participa de alguna manera en el proceso de progresión de los progenitores B.

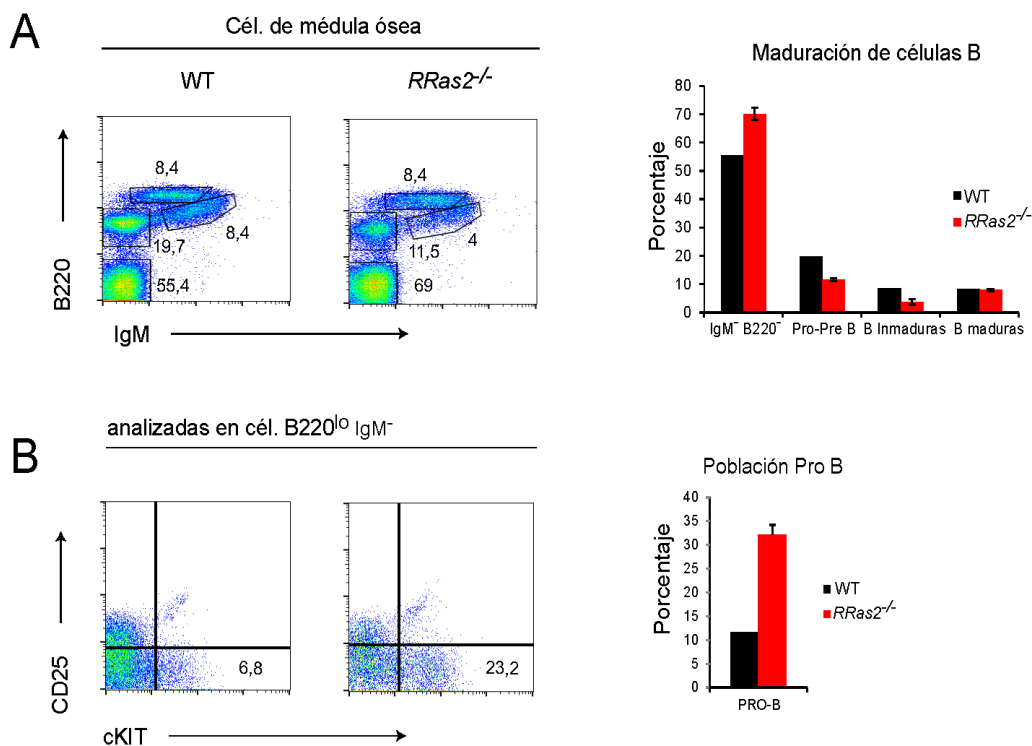


Figura 35. La deficiencia en *RRas2* causa un defecto en la conversión de los progenitores B del estadio Pro-B a Pre-B.

(A) Diagrama de citometría de flujo que muestra las distintas poblaciones de progenitores de células B en base a los marcadores B220 e IgM. La población B B220⁺ IgM^{lo} corresponde a las células B maduras, las B220^{hi} IgM^{hi} son las células B inmaduras, y las células B220^{lo} IgM⁻ son las células ProB y Pre B. La cuantificación se muestra a la derecha (n = 3 ratones por grupo).

(B) Diagramas de citometría de flujo que muestra la expresión de CD25 y cKIT en la población de B220^{lo} IgM⁻. Las células CD25⁻ cKIT⁺ (cuadrante inferior derecho) corresponden a la población Pro-B, que aparece aumentada en los ratones *RRAS2^{-/-}* como se ve en la cuantificación a la derecha.

8.2. Las células de médula ósea deficientes en RRas2 tienen una desventaja de colonización en todos los estadios de progenitores B excepto en el estadio Pro-B en experimentos de reconstitución competitiva

Puesto que los datos obtenidos a partir del fenotipado de la médula ósea de ratones WT y *RRAS2*^{-/-} apuntan a que RRas2 participa en la maduración B, nos planteamos realizar experimentos de competición de médula ósea donde se reconstituyen ratones irradiados sólo con células WT o con una mezcla de células WT y *RRAS2*^{-/-}. En este contexto, pueden ponerse de manifiesto diferencias sutiles que sean más difíciles de ver en un fenotipado normal, ya que las células de la médula ósea deficientes en RRas2 han de competir con las células WT. Para ello, irradiamos ratones de fondo genético CD45.1 con dosis subletales (10 Grays) y los reconstituimos con una mezcla de células WT de fondo genético CD45.1 y WT o *RRAS2*^{-/-} de fondo CD45.2 en diferentes proporciones (o bien 50:50 o bien 70:30, ver Figura 36A). En este tipo de experimento se puede analizar la capacidad de reconstitución y colonización de las células progenitoras de médula ósea en presencia o ausencia de RRas2 en un ambiente de competición, donde además el contexto de los animales receptores transplantados es completamente silvestre.

Nuestros resultados indican que, en efecto, las células deficientes en RRas2 presentan una desventaja competitiva en términos de repoblación de las células B de la médula ósea con respecto a las células WT, tanto en el grupo donde el cociente WT:*RRAS2*^{-/-} era igual (50:50) como en el que el cociente fue 70:30 (Figura 36 C y D). Además, este efecto es específico del linaje B ya que otras poblaciones que se generan a partir de progenitores comunes, como el linaje mielóide (CD19⁻ CD11b⁺), no se encuentran afectadas (Figura 36B). Para estudiar los distintos tipos de progenitores B dentro de la médula ósea de los ratones reconstituídos, analizamos los marcadores IgM y B220. Los análisis de citometría de flujo muestran que el defecto observado en la reconstitución en ausencia de RRas2 es aplicable a todas las subpoblaciones B: células Pro-B + Pre-B, células B inmaduras y células B maduras (Figura 36 E).

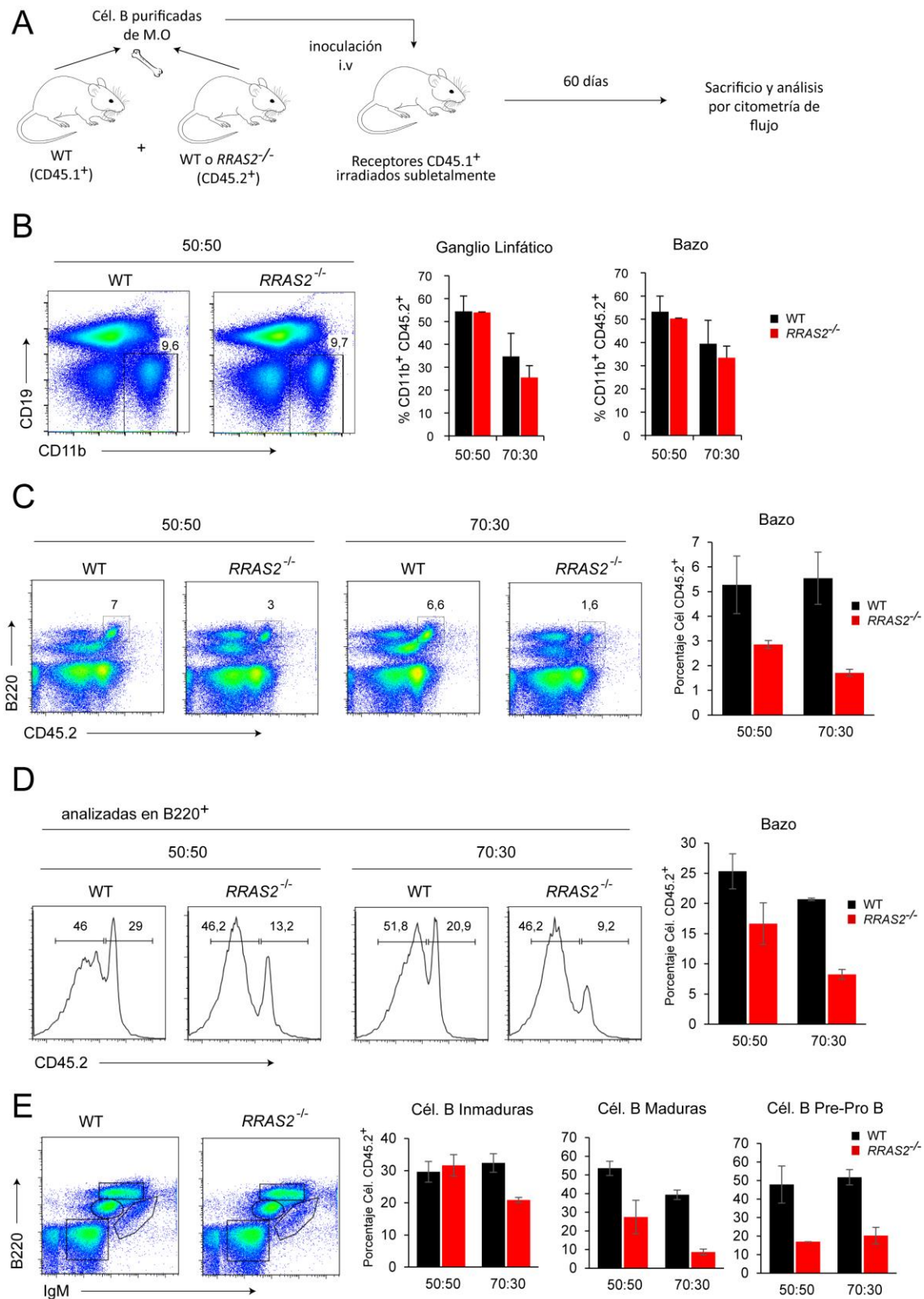


Figura 36. Las células de médula ósea deficientes en *RRas2* tienen una desventaja competitiva en la repoblación medular de ratones irradiados.

(A) Esquema del experimento de reconstitución competitiva de médula ósea. La médula ósea de ratones CD45.1 y CD45.2 (WT o *RRAS2*^{-/-}) es extraída y el total de las células recolectadas se inocula por vía i.v. en ratones de fondo genético CD45.1 irradiados con 10 Gy el día anterior. A

los 60 días post-inoculación se sacrifican los animales y se analiza el porcentaje de reconstitución.

(B) Diagrama de citometría de flujo representativo que muestra el porcentaje de reconstitución de células CD45.2⁺ WT o *RRAS2*^{-/-} que han progresado a linaje mieloide (CD11b⁺). La cuantificación de todos los ratones se muestra a la derecha.

(C) Porcentaje de contribución de las células CD45.2⁺ en los grupo donde se inyectó una proporción de 50:50 o 70:30 de células WT(CD45.1⁺):WT(CD45.2⁺) o WT(CD45.1⁺):*RRAS2*^{-/-}(CD45.2⁺). La cuantificación de todos los animales se muestra a la derecha.

(D) Diagrama de citometría de flujo representativo donde se muestran las distintas poblaciones de progenitores B en base a los marcadores de superficie IgM y B220. El porcentaje de contribución de células CD45.2⁺ en cada una de estas poblaciones se muestra en la cuantificación de la derecha (n = 4 ratones por grupo).

En vista de estos datos, nos preguntamos si el defecto observado en las células deficientes en *RRas2* se encuentra específicamente en el estadio Pro-B, como sugieren los datos presentados en la Figura 35 o podría haber un defecto anterior en poblaciones de progenitores medulares previas a la decisión de diferenciación al linaje B; esto es, en células madre hematopoyéticas (HSC), progenitores multipotentes (MPP), progenitores linfoides multipotentes (LMPP), o progenitores linfoides comunes (CLP) (Ilustración 10). Para abordar esta cuestión, realizamos un segundo experimento de reconstitución competitiva con una proporción entre células WT (CD45.1⁺) y células WT o *RRAS2*^{-/-} (CD45.2⁺) de 33:66. A continuación exploramos la reconstitución de células deficientes en *RRas2* en progenitores tempranos. Tras comprobar que la proporción entre CD45.1 y CD45.2 era la misma en ambos grupos de ratones en el conjunto de progenitores linfoides (Figura 37 A), pasamos a analizar la contribución de células CD45.2⁺ en cada una de las subpoblaciones de progenitores anteriores a la toma de decisión al linaje B. No encontramos diferencias significativas en la contribución de las células de médula ósea deficientes en *RRas2* con respecto a las células WT en ninguna de las poblaciones analizadas (ni en CLP, ni en CMP, ni en LSK) sugiriendo que *RRas2* no tiene un papel fundamental en la generación de ninguno de estos progenitores (Figura 37 B). No obstante, cuando estudiamos los marcadores IgM y B220, encontramos de nuevo un defecto en la contribución de células CD45.2⁺ en todas las poblaciones progenitoras de células B excepto en el estadio Pro-B, confirmando una vez más que *RRas2* desempeña una función en la progresión de las células B a partir de este punto concreto de la maduración (Figura 37 C).

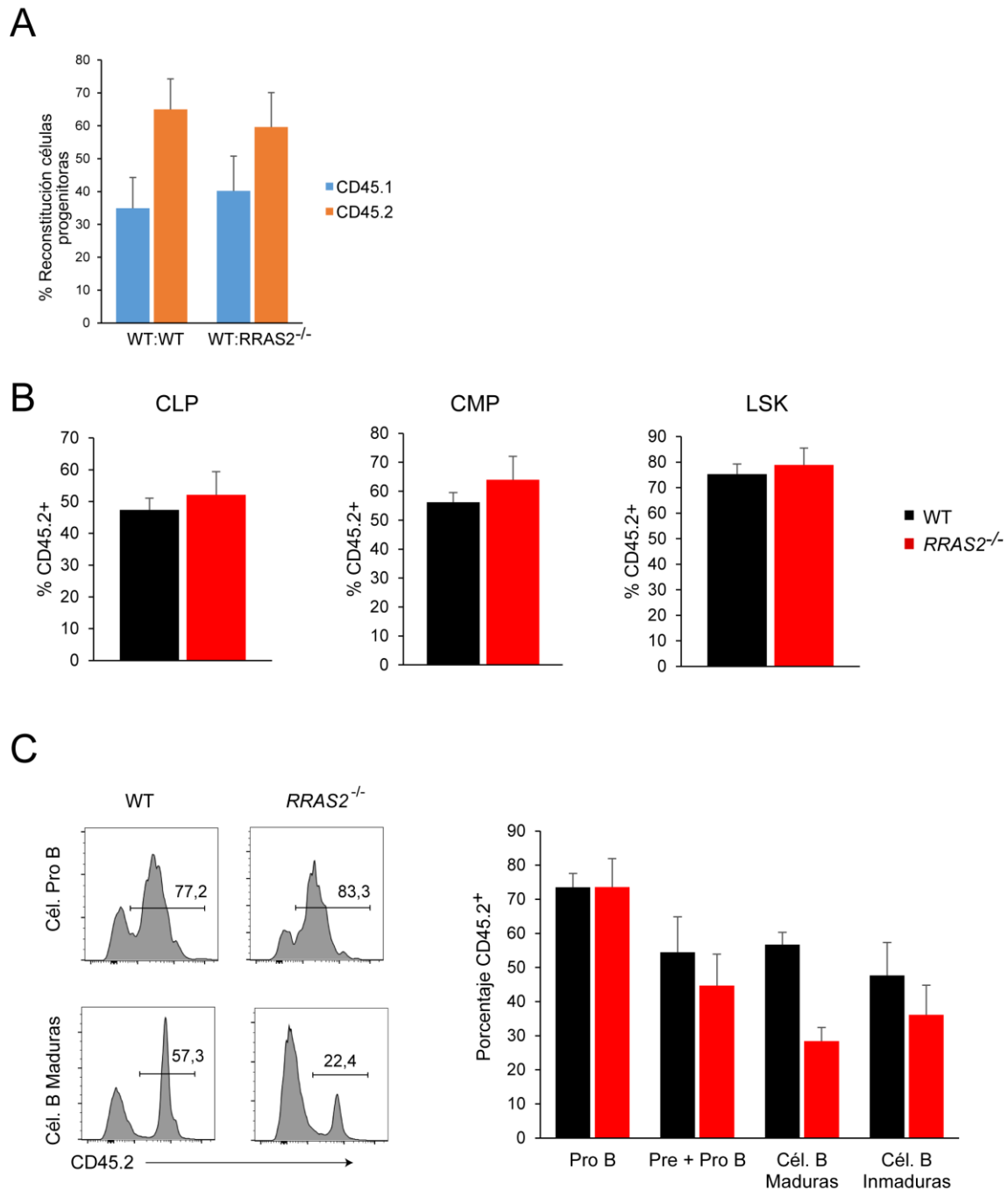


Figura 37. Las células de médula ósea deficientes en *RRas2* presentan un defecto en la reconstitución de los progenitores B a partir del estadio Pro-B.

(A) Cuantificación de la proporción de células CD45.1 y CD45.2 en el conjunto de los progenitores tempranos de la médula ósea. La proporción es similar entre los grupos WT:WT y WT:RRAS2^{-/-} indicando que los grupos son comparables entre sí.

(B) Cuantificación de la contribución CD45.2⁺ en los progenitores CLP (Lin⁻ cKIT^{lo} Sca1^{lo}), CMP (Lin⁻ cKIT⁺ Sca1⁻), y LSK (Lin⁻ cKIT^{hi} Sca1^{hi}).

(C) Histogramas de citometría de flujo representativos donde se muestra la contribución de células CD45.2⁺ WT o RRAS2^{-/-} en las poblaciones de células Pro-B (arriba) y B maduras (abajo). La cuantificación de la participación CD45.2⁺ en cada una de las poblaciones B progenitoras se muestra a la derecha (n = 5 ratones por grupo).

9. RRas2 determina la capacidad proliferativa y tumoral de una línea celular derivada de linfomas humanos

Debido a todos los resultados expuestos anteriormente, si nuestra hipótesis es correcta y RRas2 influye en el potencial oncogénico de las células, y más concretamente en nuestro caso de las células B, nos preguntamos si modificando la expresión de RRas2 en una línea tumoral linfoide podríamos alterar su capacidad proliferativa y de invasión tumoral. Para ello, utilizamos la línea celular Raji, que son células B derivadas de un linfoma de Burkitt humano. Las células Raji expresan de forma natural altos niveles de RRas2 (ver Figura 38, primer carril del inmunoblot). Por tanto, decidimos modificar los niveles de RRas2 a nivel de proteína utilizando diferentes vectores lentivirales de expresión estable.

9.1. La disminución de los niveles de expresión de *RRas2* disminuye la capacidad proliferativa de la línea celular Raji *in vitro*

En primer lugar, decidimos proceder al silenciamiento del gen *RRAS2* utilizando un vector lentiviral que contiene horquillas de ARN (shRNA) capaces de inhibir específicamente la expresión del gen *RRas2* (vector pLKO.3-shTC21 proporcionado por el Dr. Bustelo). La eficiencia del silenciamiento de *RRAS2* se analizó tras la transducción con este vector al menos una semana después de seleccionar las células en presencia de Puomicina 2µg/ml. El análisis por Western Blot de los niveles de expresión de RRas2 por parte de la línea generada (a partir de ahora Raji-RRas2-KD) indica que hay una clara disminución de RRas2 a nivel de proteína (Figura 38, 2º carril). Asimismo, a partir de la línea Raji-RRas2-KD, hicimos una segunda transducción lentiviral sobre la línea Raji-RRas2-KD con el vector pLVX-mTC21 (que clonamos en el laboratorio) conteniendo una secuencia de RRas2 con una mutación silenciosa en el sitio de reconocimiento del ARN de interferencia. De esta forma, generamos una línea (que llamamos Raji-RRas2-Rev) que sobreexpresa RRas2 y dicha sobreexpresión no se ve alterada por el ARN de interferencia. La línea Raji-RRas2-Rev se mantuvo en cultivo en presencia de Higromicina (0,2 mg/ml) al menos una semana antes de analizar por Western Blot los niveles de proteína (Figura 38).

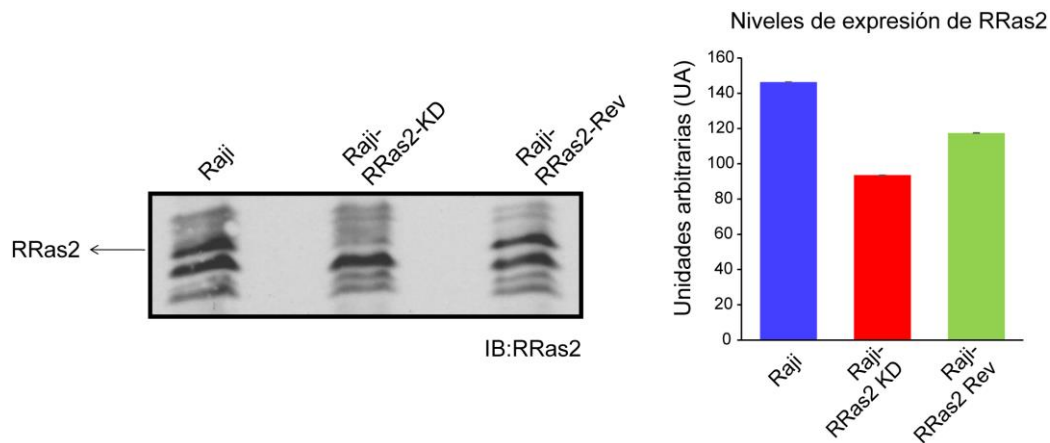


Figura 38. Niveles de expresión de RRs2 en las distintas líneas Raji.

Western Blot que muestra la proteína de RRs2 en líneas Raji sin transducir, Raji-RRas2-KD, y Raji-RRas2-Rev. A la derecha se muestra la cuantificación.

Una vez comprobada la modificación de los niveles de proteína de RRs2, quisimos determinar el efecto del silenciamiento o la reversión de la expresión de RRs2 sobre la proliferación de las células en cultivo. Para ello, partimos de un mismo número de células y crecimos las células en medio RPMI con 5% de suero fetal bovino y en presencia del antibiótico correspondiente en el caso de las líneas transducidas. Los resultados muestran que la disminución de los niveles de la proteína RRs2 es capaz de reducir la capacidad proliferativa de las células Raji (Figura 39). En cuanto a las células Raji-RRas2-Rev, éstas son capaces de proliferar mejor que las células Raji-RRas2-KD, si bien su curva de proliferación no llega a ser igual que la de las células Raji sin transducir. En suma, estos resultados indican que los niveles de proteína de RRs2 son capaces por sí solos de alterar la capacidad proliferativa de la línea celular Raji.

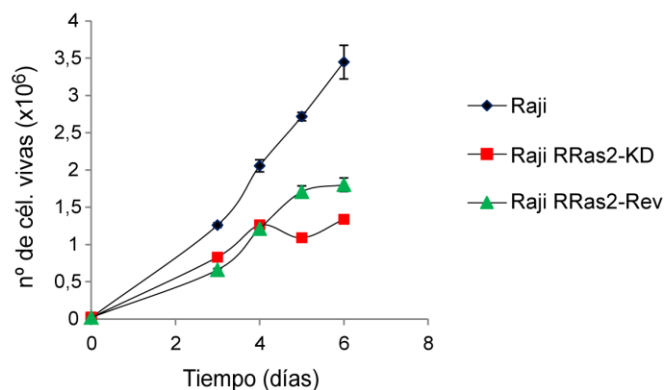


Figura 39. Las células Raji con niveles disminuidos de RRs2 tienen un defecto en proliferación *in vitro*.

Curva de proliferación *in vitro* donde hemos contado el número total de células Raji, Raji-RRas2-KD, y Raji-RRas2-Rev respectivamente.

9.2. La disminución de los niveles de RRas2 altera la capacidad tumorigénica de las células Raji *in vivo*

Puesto que la modificación de los niveles de RRas2 es capaz de modificarla proliferación de las células Raji *in vitro*, nos preguntamos si la disminución de RRas2 podría también reducir la capacidad de formación tumores *in vivo*. Para ello hicimos experimentos de xeno-injertos donde inoculamos por vía i.v 1×10^6 de células Raji en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID) para evaluar la capacidad de formación de tumores en un modelo en el que no hay rechazo hacia las células transplantadas (Figura 40A). Se ha descrito que las células Raji son capaces de formar neoplasias en ratones NOD-SCID que se manifiestan a través de una parálisis de las extremidades posteriores a partir de los 18 días post-transplante (Vallera et al., 2009). En nuestro experimento, los ratones inyectados con células Raji empezaron a manifestar síntomas a los 18 días post-inoculación, tras lo que se procedió al sacrificio. Dos de los ratones inyectados con células Raji con niveles disminuidos de RRas2 manifestaron síntomas a los 20 días post-inoculación y los otros 3 a los 30 días (Figura 40B). Por otro lado, además de los síntomas de parálisis, en el momento del sacrificio sólo encontramos tumores sólidos en uno de los 5 ratones inyectados con Raji-RRas2-KD del estudio, mientras que en el caso de los ratones inyectados con Raji encontramos masas tumorales en 3 de ellos (Figura 40C). Cuando analizamos por citometría de flujo la presencia de células Raji en la médula ósea de estos ratones, encontramos una media del 53% de invasión tumoral en el caso de los ratones inoculados con Raji, llegando al 85% en uno de los casos, mientras que en el caso de los ratones inyectados con células Raji-RRas2-KD el porcentaje más alto fue del 18% a los 30 días post-inoculación (Figura 40D). Estos resultados sugieren que RRas2 determina la capacidad proliferativa y de invasión tumoral *in vivo*.

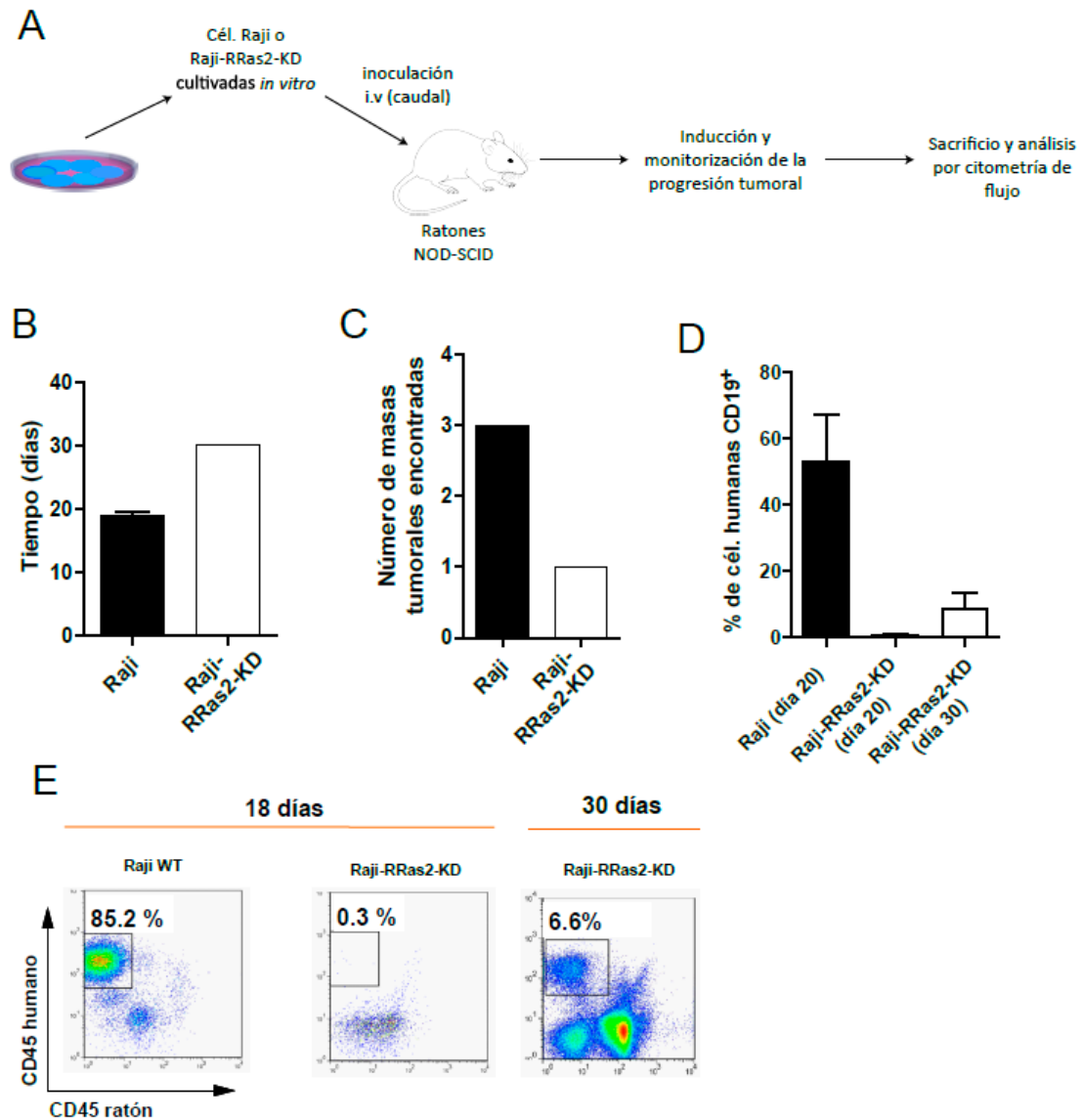


Figura 40. Las células Raji con niveles disminuidos de RRas2 presentan una desventaja proliferativa y de invasión tumoral *in vivo*.

(A) Diseño experimental del xeno-injerto en el que se inoculan en la vena caudal (i.v) células Raji crecidas en cultivo con distintos niveles de expresión de RRas2.

(B) Tiempo de supervivencia de los ratones NOD-SCID inoculados con células Raji o Raji-RRas2-KD.

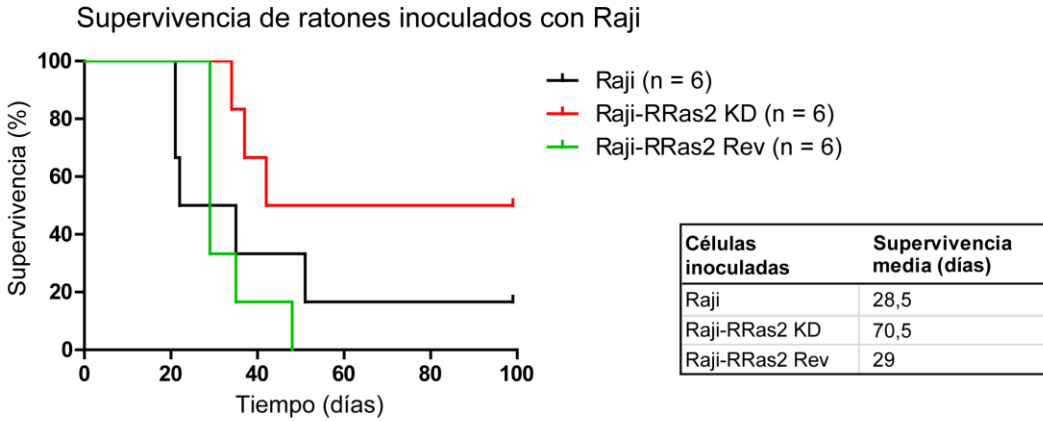
(C) Frecuencia de tumores sólidos en los ratones NOD-SCID inoculados con Raji o Raji-RRas2-KD.

(D) porcentaje de invasión de células Raji en médula ósea de ratones NOD-SCID, analizadas por citometría de flujo con el marcador CD19 humano.

(E) Diagramas representativos de citometría de flujo donde se muestra la presencia de células Raji humanas en función de los marcadores CD45 y CD19 humanos en la médula ósea de los ratones NOD-SCID inoculados.

Dado que contábamos con la línea Raji-RRas2-Rev, donde habíamos revertido la expresión de RRas2 sobre la línea Raji-RRas2 KD, quisimos comprobar si aumentando los niveles de RRas2 podíamos rescatar el fenotipo obtenido con las células Raji WT. Para ello, inoculamos de nuevo 1×10^6 de células de cada una de las líneas de Raji por vía i.v en ratones inmunodeficientes y monitorizamos su supervivencia. Los ratones inoculados con células Raji-RRas2 Rev manifestaron los síntomas de parálisis y por tanto tuvieron que ser sacrificados mucho antes que los inoculados con Raji con niveles disminuidos de RRas2 (Figura 41A). Cuando analizamos por citometría de flujo el porcentaje de invasión de las células Raji en la médula ósea, en esta ocasión no encontramos diferencias significativas entre los ratones inoculados con Raji WT y con Raji-RRas2-KD, pero la médula ósea de los ratones que habían recibido células Raji-RRas2-Rev estaba más invadida que los otros dos grupos (Figura 41B).

A



B

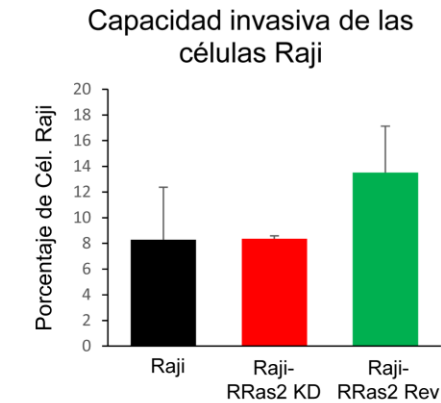


Figura 41. Supervivencia de los ratones inoculados con células Raji.

(A) Curva de Kaplan-Meier que muestra la supervivencia de los ratones SCID inoculados con Raji WT, Raji-RRas2 KD, o Raji-RRas2-Rev. La supervivencia media (en días) se muestra en la tabla de la derecha (n = 6 ratones por grupo).

(B) Cuantificación del porcentaje de células Raji encontradas en la médula ósea de los ratones inoculados según la detección por citometría de flujo del marcador CD19 humano.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. El papel no redundante de RRas2 en la formación de centros germinales

En este trabajo hemos analizado en profundidad el papel de la GTPasa RRas2 en la formación de los centros germinales. Previamente habíamos demostrado que RRas2 es esencial para la supervivencia y proliferación homeostática de las células B maduras (Delgado et al., 2009). Ahora hemos descrito una nueva función para RRas2 en el control y desarrollo de los centros germinales.

RRas2 presenta una gran similitud en su secuencia con el miembro de su misma familia RRas1 así como con los miembros de la familia de Ras clásicas: H-Ras, K-Ras y N-Ras. A pesar de esta homología, los ratones deficientes en RRas1 o en las Ras clásicas H-Ras y N-Ras no manifiestan ningún defecto en la formación de centros germinales, mientras que RRas2 sí los muestra. Esto indica que el papel de RRas2 en la formación de los centros germinales es verdaderamente específico y no redundante con otros miembros cercanos. Los estudios previos con ratones transgénicos que expresan el mutante dominante negativo de H-Ras sugerían que las respuesta de las células B de memoria requieren a las proteínas Ras clásicas que proporcionan señales de supervivencia (Takahashi et al., 2005). Sin embargo, es importante destacar que el uso de dominantes negativos de H-Ras no sólo disminuye la actividad de los 3 miembros de la familia Ras clásica (Farnsworth and Feig, 1991) sino que también afecta a la actividad de RRas2 ya que todas estas proteínas comparten efectores y proteínas reguladoras, y presentan secuencias de los bucles de unión a nucleótidos completamente idénticas (Alarcon and Martinez-Martin, 2012). Teniendo en cuenta nuestros resultados anteriores (Delgado et al., 2009) y nuestros datos actuales que muestran que RRas2 y no las Ras clásicas controlan la reacción de los CG, proponemos que algunas, si no la mayoría de las funciones inicialmente atribuidas a las Ras clásicas en linfocitos B son de hecho funciones que está desempeñando RRas2.

1.1. Los miembros de las Ras clásicas no compensan la pérdida de la actividad RRas2

A pesar de que la activación de la ruta Raf-ERK-MAPK y PI3K-Akt son dos de las principales rutas activadas por las Ras clásicas, existen evidencias *in vitro* e *in vivo* de que RRas2 juega un papel no redundante en la activación de PI3K. Esta especialización funcional de RRas2 es particularmente crítica en las células linfoides dado que RRas2 y no las Ras clásicas pueden interaccionar y activar la subunidad catalítica p110δ de PI3K (Rodriguez-Viciano et al., 2004). La subunidad p110δ se expresa únicamente en las células de linaje hematopoyético (Vanhaesebroeck et al., 1997) y parece tener una

actividad catalítica independiente de las subunidades regulatorias (Zhao and Vogt, 2008). Es más, la ablación genética de esta subunidad provoca una severa reducción de los linfocitos B de zona marginal (MZ), una proliferación homeostática disminuida y un defecto en la formación de los CG (Okkenhaug et al., 2002, Pauls et al., 2012), un fenotipo muy parecido al de los *RRAS2*^{-/-}. Por lo tanto, proponemos que la función no redundante de RRas2 en linfocitos B se debe a su papel activador de PI3K a través de p110δ.

1.2. Mecanismos moleculares mediados por RRas2 en el centro germinal

En este trabajo hemos demostrado que RRas2 interviene en la formación de centros germinales mediando las señales proliferativas y de diferenciación provistas por dos receptores clave de los linfocitos B: el BCR y CD40. Nuestro grupo había demostrado anteriormente que RRas2 es responsable del reclutamiento directo de p110δ al BCR, posicionando a esta GTPasa como uno de los mecanismos responsables de la activación de PI3K a través del BCR, junto con BCAP y Nck (Castello et al., 2013, Pauls et al., 2012, Delgado et al., 2009). En este estudio mostramos que RRas2 media la activación de PI3K en los linfocitos B de CG no sólo a través del BCR sino también a través de CD40. Las señales derivadas del BCR y de CD40 son esenciales para la correcta formación del CG, ya que ambos receptores proporcionan señales de supervivencia y proliferación a las células B de CG de la zona clara (LZ), que en consecuencia migran a la zona oscura (DZ) para comenzar o re-iniciar la rápida proliferación celular característica de esta zona; una fase independiente del BCR y de CD40. El hecho de que los pocos linfocitos B de CG detectados en los ratones *RRAS2*^{-/-} presenten marcadores de zona oscura, junto con el hallazgo de que la gran mayoría de células de CG que incorporan BrdU son también células de DZ (más incluso que en los controles silvestres) indica que RRas2 es un componente crítico para la supervivencia y proliferación de las células B de zona clara. Estos datos apoyan de nuevo el posicionamiento de RRas2 inmediatamente por debajo del BCR y de CD40.

1.3. Regulación de RRas2 de la proliferación celular mediada por el BCR y CD40

Puesto que p110δ es fundamental en la formación de los CG, y RRas2 activa directamente p110δ, era natural pensar que el papel de RRas2 en la formación de los GC está relacionado con la regulación de la actividad PI3K. Sin embargo, también hemos encontrado que Blimp-1 e IRF4, dos reguladores maestros de los CG, se expresan más débilmente en los linfocitos B de CG *RRAS2*^{-/-} que en los respectivos controles silvestres. Puesto que IRF4 controla la expresión de Blimp-1 y la transcripción de IRF4 está controlada por la familia de factores de NFκB, analizamos si la deficiencia en RRas2 podría estar afectando la actividad NFκB. Los linfocitos B de ratones *RRAS2*^{-/-} fueron incapaces de activar plenamente la vía alternativa de NFκB en respuesta a los estímulos del BCR y de CD40, mientras que en la vía clásica no encontramos alteraciones. Se sabe

que CD40 activa la vía alternativa de NFκB, cuyos miembros p52 y RelB son esenciales para la formación de los CG (Goetz and Baldwin, 2008). Por tanto, el papel de RRas2 en la formación de los CG podría estar mediado por la activación de la vía alternativa de NFκB además de la de la vía de PI3K. Sin embargo, RRas2 no interacciona en principio con la serín/treonín quinasa NIK, reguladora de esta vía a través la fosforilación de los homodímeros de IKKα. No obstante, se ha propuesto que Akt activa a IKKα a través de la fosforilación en el residuo T23. Dado que hemos encontrado que la fosforilación de la T23 en respuesta a los estímulos del BCR o de CD40 está reducida en ausencia de RRas2, proponemos un modelo en el que RRas2 se sitúa inmediatamente por debajo de los dos receptores, ejerciendo un papel activador de las rutas de PI3K-Akt y de la vía no canónica de NFκB.

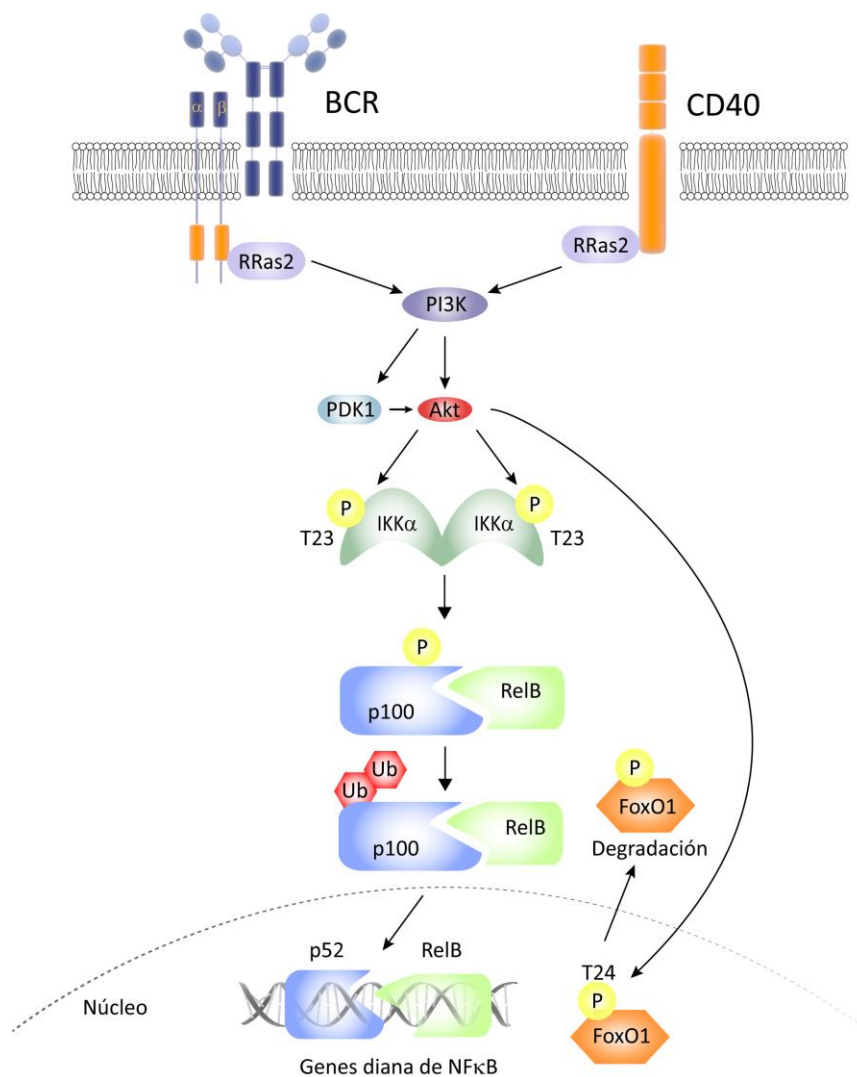


Ilustración 11. Modelo de RRas2 como mediador de las señales procedentes del BCR y de CD40.

Esquema donde se propone que RRas2 estaría situado inmediatamente debajo de los receptores del BCR y de CD40. RRas2 funcionaría como un nexo de confluencia entre las vías de PI3K y la no canónica de NFκB, ambas rutas esenciales para el correcto desarrollo de los CG.

Por otro lado, nuestros datos demuestran que RRas2 está ejerciendo un papel importante en la regulación de FoxO1, otro de los factores de transcripción fundamentales en la reacción de los CG (Dengler et al., 2008). De hecho, FoxO1 no sólo cumple un papel en los CG, sino que su inactivación por parte de Akt es clave en la supervivencia de los linfocitos B en reposo, dando una idea de la importancia de las señales derivadas del BCR vía PI3K-Akt en la llamada señalización tónica (Srinivasan et al., 2009). Recientemente, el grupo de Klaus Rajewsky ha propuesto que existe una interrelación entre las señales procedentes del BCR y de otros receptores de membrana de los linfocitos B no específicos de antígeno (Otipoby et al., 2015). Este estudio sitúa a la vía de PI3K-FoxO1 en el eje central en la comunicación entre receptores. De esta forma, PI3K estaría promoviendo la proliferación de los linfocitos B no sólo en respuesta al BCR como tradicionalmente se ha considerado, sino también en respuesta a la activación de receptores de la inmunidad innata. Esto refleja la necesidad fisiológica de integrar la información procedente de interacciones específicas de antígeno con las señales derivadas del contexto y la naturaleza de la sustancia que ha inducido la respuesta inmune. Este hecho es particularmente relevante en la reacción de los centros germinales, donde la especificidad del BCR ha de coordinarse muy estrechamente con la ayuda procedente de las células T foliculares a través de CD40. Nuestros datos concuerdan perfectamente con esta línea, ya que RRas2 aparece como el elemento integrador de las señales del BCR y de CD40 a través de la vía PI3K.

1.4. RRas2 en la dinámica de los linfocitos B dentro del CG

El defecto específico de la población de linfocitos B de zona clara de los ratones *RRAS2*^{-/-} apoya el actual modelo de la reacción de CG en el que la zona oscura es el lugar de expansión clonal de las células B y donde se produce el proceso de edición del receptor de antígeno; mientras que la zona clara constituye el lugar de selección en base a la interacción con el antígeno y a la ayuda T. Por otra parte, la presencia de una población inmadura de células de CG en ratones *RRAS2*^{-/-} y el colapso de linfocitos B de zona clara en la fase S del ciclo celular apoya el modelo del “reloj celular” del CG propuesto por el grupo de Jason Cyster. Según este modelo, la conversión entre células de zona oscura y zona clara progresa independientemente de cualquier señal derivada de la zona oscura, mientras que la señalización procedente del BCR y de CD40 en la zona clara se requiere para reiniciar el reloj y volver a entrar en el estadio de zona oscura (Bannard et al., 2013). RRas2 parece ser esencial en este proceso al mediar la señalización de BCR y de CD40 en los linfocitos B de zona clara, y la activación de las vías PI3K y la no canónica de NFκB. Esta observación sitúa a RRas2 como una proteína clave en la activación de una de las rutas de señalización reguladas diferencialmente al alza en los linfocitos B de zona clara y oscura: la de NFκB (Victoria and Nussenzweig, 2012), controlando por tanto la progresión de la reacción de los CG. La relevancia y la especificidad mostrada por RRas2 en la homeostasis de los linfocitos B y en la formación de los CG señala la necesidad de seguir profundizando en la investigación de esta GTPasa con el objeto de determinar su participación en otros procesos como por

ejemplo el desarrollo de células B, que se discutirá más adelante. En este sentido, el papel de RRas2 como regulador de la señalización no sólo de los receptores de antígeno (TCR y BCR) sino también de CD40, cimienta el camino hacia estudios futuros que aborden la relevancia de RRas2 en la señalización de otros receptores claves de la biología de las células linfoides como CD19 o CD28.

2. Regulación metabólica de RRas2 en los linfocitos B

Los linfocitos vírgenes que circulan por el organismo en condiciones basales se caracterizan por encontrarse en un estado de reposo. Sin embargo, una de las marcas distintivas del sistema inmune es la capacidad de los linfocitos de responder muy rápidamente a los procesos de infección e inflamación. De esta forma, cuando los linfocitos reconocen una sustancia extraña reciben señales estimulatorias que los activan y promueven una rápida y extensa proliferación, al tiempo que asumen funciones dirigidas a controlar o neutralizar al microorganismo invasor. En los últimos años se han acumulado las evidencias de que los cambios metabólicos en los linfocitos no sólo sustentan el proceso de activación sino que son absolutamente esenciales, ya que los linfocitos asumen sus funciones efectoras sólo si adoptan unas características metabólicas correctas (Pearce et al., 2013). Por esta razón, existe un gran interés en dilucidar los mecanismos de regulación metabólicos que apoyan y dirigen los cambios funcionales de los linfocitos.

La glucosa es el principal nutriente a partir del cual se puede generar ATP a través de dos rutas metabólicas integradas: la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs. Durante la glucólisis, que tiene lugar en el citosol, una molécula de glucosa da lugar a dos moléculas de piruvato y en esa conversión se liberan dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. A su vez, las moléculas de piruvato (si no hay condiciones de hipoxia) se convierten en acetil-CoA, que entra en las mitocondrias para realizar el ciclo TCA. Durante el ciclo TCA se generan los compuestos reducidos NADH y FADH₂ que aportan los electrones que nutren a la cadena transportadora de electrones mitocondrial (de sus siglas en inglés OXPHOS). Únicamente cuando no hay oxígeno disponible, las moléculas de piruvato generadas durante la ruptura de la glucosa se transforman en ácido láctico en lugar de transportarse a la mitocondria en forma de acetil-CoA.

La reprogramación metabólica que experimentan los linfocitos durante la activación puede hacerse a través de diferentes vías. En el caso de los linfocitos T existen varios estudios en los que se ha visto que se produce un fuerte incremento de la glucólisis, incluso en condiciones no limitantes de oxígeno, tras el contacto del TCR con el antígeno (revisado en Pearce et al., 2013). Este aumento de la glucólisis va acompañado de un aumento de la expresión del transportador de glucosa Glut1 de forma dependiente de PI3K, promoviendo una actividad de glucólisis aerobia semejante a la que se produce en células cancerígenas (Jacobs et al., 2008). En los linfocitos B

PI3K/Akt puede activar un mecanismo similar tras el contacto del BCR con el antígeno, incrementándose los niveles de Glut1 y por tanto su tasa metabólica (Doughty et al., 2006). Sin embargo, se ha observado que en condiciones fisiológicas la activación de los linfocitos B produce un aumento equilibrado tanto de la glucólisis como de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Caro-Maldonado et al., 2014). Estos hallazgos indican que las rutas implicadas en el cambio metabólico de las células B son diferentes al de otras células del sistema inmune adaptativo como las células T o los macrófagos, al menos en condiciones fisiológicas. En otras condiciones, como por ejemplo ante la exposición continuada a altos niveles de citoquinas como BAFF, se produce una reprogramación metabólica en los linfocitos B hacia la glucólisis aerobia, de manera similar a lo que ocurre con los linfocitos T. De manera opuesta, los linfocitos B anérgicos son incapaces de reprogramar su metabolismo en absoluto (Caro-Maldonado et al., 2014). No obstante, estas últimas observaciones sugieren acontecimientos que pueden darse en condiciones patológicas como la tolerancia o la autoreactividad más que ser informativas de procesos de la respuesta inmune normal de las células B.

Por tanto, el metabolismo oxidativo o mitocondrial adquiere una especial relevancia en el estudio de la inmunidad mediada por los linfocitos B. Las mitocondrias constituyen orgánulos esenciales para la supervivencia de las células eucariotas, ya que son responsables de la generación de la mayor parte del ATP que la célula usa como fuente de energía química. Además, la mitocondria está involucrada en multitud de procesos celulares como la diferenciación celular, la apoptosis, y el control del crecimiento y del ciclo celular. En esta línea, recientemente se ha publicado un estudio que demuestra que cambios estocásticos en la producción de especies reactivas de oxígeno de la mitocondria (ROS_m) en los linfocitos B activados y la repercusión que esos cambios tienen sobre su masa y potencial mitocondrial determina que los linfocitos B se diferencien hacia células plasmáticas o por el contrario inicien el programa de cambio de clase de las inmunoglobulinas (Jang et al., 2015). Estos datos muestran de nuevo la relevancia de la función mitocondrial en la población B. Por otro lado, el grupo de Martin Turner ha demostrado recientemente que la regulación traduccional de genes que codifican moléculas del metabolismo energético de la mitocondria, así como la prevención de la acumulación excesiva de ROS es esencial para realizar el cambio de clase de las inmunoglobulinas y para la producción de anticuerpos (Diaz-Munoz et al., 2015).

2.1. Implicación de la ruta de PI3K en el metabolismo de los linfocitos B

Se sabe que la regulación de la traducción de los ARN mensajeros (ARN_m) demanda una elevada producción de ATP por parte de las mitocondrias. El complejo mTORC1, el cual está regulado por PI3K, está involucrado en este proceso ya que estimula la traducción de ARN_m y otros procesos anabólicos como por ejemplo la lipogénesis en respuesta a señales extracelulares (hormonas, oxígeno, nutrientes, etc.) (Laplanche and Sabatini, 2012). El complejo mTORC1 fosforila a las proteínas 4E-BP, que

al fosforilarse se disocian de la proteína eIF4E, permitiendo que ésta forme un complejo junto con eIF4G y eIF4F que iniciará la traducción de los ARN mensajeros uniéndose al extremo 5' de los mismos (Ilustración 12). A su vez, mTORC1 también fosforila a pS6K, iniciando una cascada de señalización que termina en la activación de proteínas como la proteína ribosomal S6 relacionadas también con la traducción de los ARN mensajeros (Banerjee et al., 1990, Dorrello et al., 2006, Kozma et al., 1990, Shahbazian et al., 2006). Por último mTORC1 también regula otras funciones metabólicas al activar las proteínas PGC-1 α , HIF1- α , y otras (Duvel et al., 2010) (Ilustración 12).

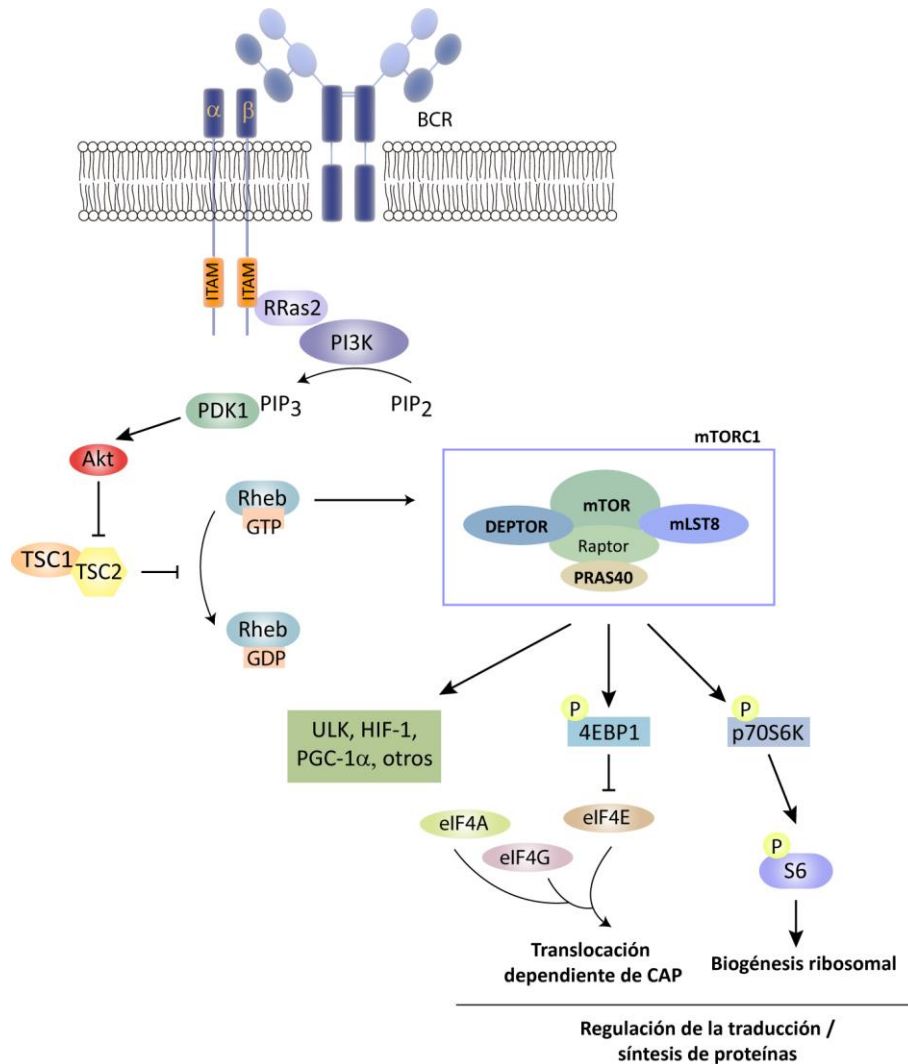


Ilustración 12. Esquema de la ruta del complejo mTORC1 mediada por PI3K.

El complejo mTORC1 regula la traducción de ARN mensajeros a través de múltiples efectores. Por un lado, fosforila a las proteínas 4EBP permitiendo que se libere el factor eIF4E, que se asocia con eIF4E y eIF4G. El complejo formado por estas tres últimas proteínas se unen al extremo 5' de los ARN mensajeros (ARNm) participando en la traducción de los mismos. Por otro lado, mTORC1 también fosforila a p70S6K activándolo, de forma que éste actúa sobre su efector, S6, un componente de la subunidad ribosomal 40S, esencial para la traducción de los ARNm. Por último, mTORC1 también actúa sobre diversos efectores relacionados con el metabolismo, como la quinasa promotora de autofagia ULK, el factor inducible por hipoxia HIF-1, o el co-activador transcripcional PGC-1 α .

En este contexto, se ha publicado recientemente un trabajo que vincula la actividad del complejo mTORC1 con el control de la actividad y biogénesis mitocondrial (Morita et al., 2013). En este estudio se demuestra que el uso de inhibidores de mTOR causa una disminución en la producción de ATP que se asocia con una reducción de la actividad mitocondrial y de la glucólisis. Esto se debe a que el bloqueo de mTOR afecta a la traducción de un conjunto de ARNm que codifican proteínas mitocondriales tales como las subunidades del complejo V (la ATP-sintasa de la cadena respiratoria) o el factor de transcripción A mitocondrial TFAM. Por tanto, mTORC1 controla la actividad respiratoria y la biogénesis de las mitocondrias, lo que revela un mecanismo en el que la traducción de ARN mensajeros influye en la función mitocondrial y en el mantenimiento de la homeostasis energética de la célula. En cuanto a lo referente a la reacción de los centros germinales, se ha comprobado que los ratones con una deficiencia de mTOR específica de las células B desarrollan menos centros germinales y presentan un defecto en la producción de anticuerpos de alta afinidad así como en los procesos de cambio de clase de las inmunoglobulinas y en la hipermutación somática debido a una disminución en la transcripción de AID (Zhang et al., 2013).

El conjunto de todos estos avances abren un campo de investigación donde el metabolismo mitocondrial adquiere un papel protagonista en la funcionalidad de las células B y en la reacción de los centros germinales, arrojando luz sobre un campo que ha permanecido inexplorado hasta ahora. En este contexto, nosotros hemos demostrado que la GTPasa RRas2, que juega un papel esencial en la supervivencia de las células B y en el desarrollo de los centros germinales, regula también funciones metabólicas de las células B de CG. Consecuentemente, en ausencia de RRas2 las células B no son capaces de cumplir las exigentes demandas energéticas a las que se encuentran sometidas dichas células tras la activación y diferenciación en células de CG. Nuestros datos apoyan por tanto la idea de que la actividad mitocondrial desempeña una función decisiva en la biología de las células B y muy especialmente durante el proceso de activación de las mismas en respuesta a un antígeno. Además, puesto que mTOR es uno de los principales efectores de PI3K, proponemos que la regulación de RRas2 sobre el metabolismo de las células B de CG se da precisamente a través de la modulación de esta vía (Ilustración 12). Nuestros resultados aportan evidencias de que RRas2 participa en la señalización mediada por el BCR y por CD40 en la zona clara del centro germinal. En esta zona, el receptor de antígeno que ha sufrido un proceso de edición durante la fase de la zona oscura se pone a prueba y sólo sobreviven las células B que expresan un receptor con una afinidad mejorada hacia el antígeno. Las células B que presentan aberraciones tales como la expresión de un BCR no funcional o con baja afinidad por el antígeno entran en apoptosis. Esta selección negativa también afecta a las células B que durante el proceso de maduración del CG desarrollan afinidad contra antígenos propios. El hecho de que RRas2 esté realizando su función en la zona clara y que regule el metabolismo de las células B de CG nos hace pensar en la posibilidad de que RRas2 pueda funcionar como un modulador de la respuesta inmune interviniendo en el proceso de selección negativa y positiva al regular la vía de PI3K y la actividad mitocondrial. Los mecanismos moleculares por los cuales las células B son derivadas a

programas apoptóticos en el CG son todavía una incógnita. Nuestros datos podrían sugerir una vía por la cual las células B que deben extinguirse lo hacen porque dichas células son incapaces de cumplir las demandas energéticas a las que se ven sometidas durante la reacción de los centros germinales. De esta forma, proponemos un mecanismo en el que las células B que, por distintos motivos, no deben progresar en la reacción de CG sufrirían un “ahogamiento” metabólico por el que no se produciría suficiente energía química, y que estaría mediado por la ruta de PI3K-mTOR (Ilustración 12).

3. El papel de RRas2 en la formación de neoplasias linfoides

Dado el papel que RRas2 desempeña en la formación de los centros germinales y dada la estrecha relación entre éstos y los linfomas B maduros, nos parece fundamental explorar el vínculo de esta GTPasa en procesos de linfomagénesis. De hecho, excepto los linfomas de las células del manto, la leucemia linfoblástica, y algunos tipos de leucemia linfocítica crónica, la inmensa mayoría de los linfomas de tipo B se generan a partir de linfocitos B de algún estadio de la reacción de los centros germinales o que ya han pasado por ella. Esto se ha podido comprobar gracias a la detección de mutaciones somáticas en los genes de las inmunoglobulinas y de translocaciones cromosómicas en las células tumorales de los linfomas B. Como se ha explicado anteriormente, éstas son marcas que van asociadas al proceso de hipermutación somática y de reordenación cromosómica del cambio de clase asociadas a la enzima AID del CG (Klein and Dalla-Favera, 2008).

En este sentido, cabe resaltar que RRas2 es la única GTPasa no clásica de la familia Ras que se ha encontrado mutada o sobre-expresada en diversos tipos de cáncer. El grupo de Xosé Bustelo ha demostrado que RRas2 participa en las primeras etapas de la carcinogénesis de mama así como en los procesos metastáticos posteriores (Larive et al., 2014). Estos datos constituyen el primer indicio sólido en modelos de ratón que establecen la función de RRas2 como un oncogén. Por otro lado, recientemente se ha descubierto también una participación de RRas2 en tumores de origen nervioso (Gutierrez-Erlandsson et al., 2013).

En cuanto a tumores de tipo linfoides, hasta ahora el único estudio que aborda esta cuestión es el artículo de nuestro laboratorio donde se han encontrado altos niveles de expresión de RRas2 en muestras humanas procedentes de pacientes tanto con linfomas de Hodgkin como de no-Hodgkin, incluyendo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), que es el linfoma más frecuente entre la población adulta (Delgado et al., 2009). En un intento de establecer si existe una correlación concreta entre la expresión de RRas2 y algún tipo de neoplasia linfoides específica, analizamos por PCR cuantitativa la expresión de RRas2 en un panel de linfomas humanos. Nuestros resultados indican que si bien RRas2 se encuentra expresado a niveles muy altos en muchas de las muestras tumorales analizadas, su expresión no correlaciona con un tipo

de linfoma o leucemia en concreto, al menos entre los tipos de cáncer incluidos en nuestro panel. No obstante, utilizando la base de datos Oncomine hemos podido analizar los niveles de expresión de RRas2 entre un rango más amplio de patologías linfoides en comparación con muestras de pacientes normales. Hemos observado que existe una correlación entre la sobreexpresión de RRas2 y la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) de forma bastante específica, una neoplasia que no estaba incluida en nuestro panel de muestras tumorales inicial (Ilustración 13). Este dato adquiere una especial relevancia si tenemos en cuenta que la B-CLL es el tipo más común de leucemia entre la población adulta occidental.

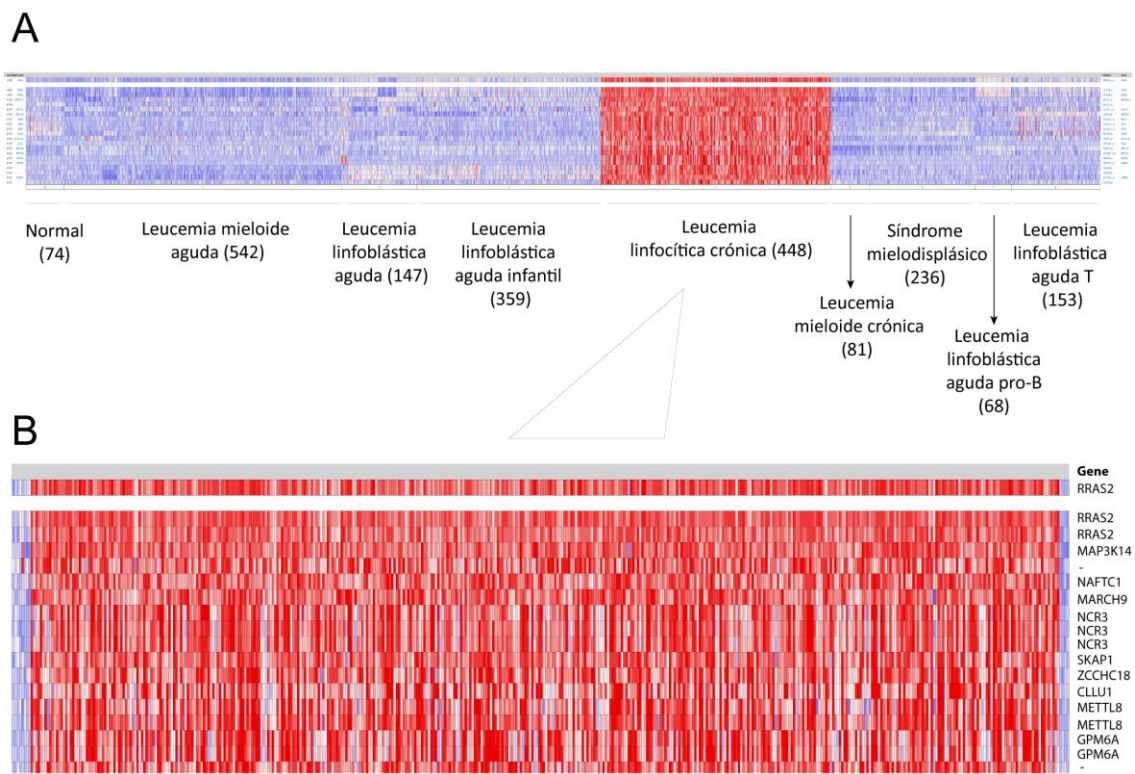


Ilustración 13. Patrón de expresión de RRas2 en diferentes tipos de linfomas.

(A) Análisis de expresión de RRas2 (primera línea) en muestras de voluntarios normales (parte de la izquierda) y en muestras procedentes de diferentes patologías. Debajo de RRas2 aparecen los genes cuya expresión correlaciona mejor con la de RRas2. El azul representa niveles bajos de expresión y el rojo niveles altos de expresión. Entre paréntesis está indicado el número de muestras de cada tipo de linfoma.

(B) Se muestra ampliado el conjunto de muestras correspondiente a pacientes de B-CLL. Imagen tomada de la base de datos Oncomine (www.oncomine.org).

Además, si comparamos la expresión de todos los miembros de la familia Ras clásica y de R-Ras en la B-CLL podemos comprobar que el aumento en los niveles de RRas2 en esta enfermedad es verdaderamente específica, ya que el patrón de expresión del resto de GTPasas de estas familias no presenta una diferencia significativa en comparación con muestras de voluntarios sanos (I

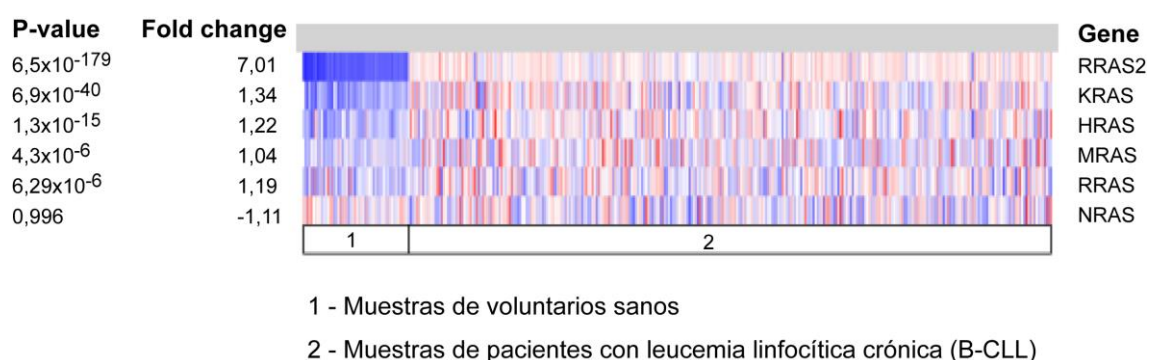


Ilustración 14. Expresión de los diferentes miembros Ras en la B-CLL.

Array que muestra el patrón de expresión comparando muestras de voluntarios sanos (grupo 1) con pacientes de leucemia linfocítica crónica (B-CLL, grupo 2). Modificado de la base de datos Oncomine (www.oncomime.org).

La B-CLL se caracteriza por la acumulación de células B maduras CD5⁺ en la sangre, médula ósea y tejidos linfoides. Fenotípicamente otros rasgos distintivos de la B-CLL es la baja expresión de inmunoglobulina en membrana y expresión de CD23 y CD19 (revisado en Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, existe una gran heterogeneidad clínica entre los pacientes de B-CLL, pudiendo desde no manifestar síntomas hasta progresar de forma muy agresiva. En cuanto al origen de la enfermedad, aproximadamente el 60% de los casos presentan mutaciones en la región variable de las inmunoglobulinas mientras que el 40% restante no presenta dichas mutaciones. En base a esta distinción se pueden establecer dos grandes grupos de B-CLL: las primeras, con células cancerosas que proceden o han atravesado la reacción de los centros germinales, y las segundas que proceden de células B vírgenes, lo que se asocia con una peor prognosis (Rodríguez et al., 2015). En los últimos años se ha hecho un enorme esfuerzo científico internacional por caracterizar molecularmente un gran número neoplasias a través del Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (ICGC) en el que se han secuenciado los genomas completos de cientos de pacientes. En el caso particular de las B-CLL, se ha demostrado a través del seguimiento de mutaciones recurrentes que existe una compleja evolución clonal de la enfermedad (Quesada et al., 2012, Puente et al., 2011, Landau et al., 2013, Fabbri et al., 2011, Rossi et al., 2012, Ramsay et al., 2013). Estos estudios apuntan a que existe no sólo una gran diversidad molecular entre los pacientes de B-CLL, sino también una heterogeneidad intratumoral.

Teniendo esto en cuenta, sería interesante estudiar posibles alteraciones que se puedan estar produciendo en la expresión o en la actividad de RRas2 en pacientes de B-

CLL. Los datos del consorcio ICGC ofrecen una visión de la gran complejidad existente en esta enfermedad, y pone de manifiesto el hecho de que la agrupación de las neoplasias basada en características fenotípicas o sintomatológicas no corresponde con la naturaleza molecular de los distintos cánceres. El campo de investigación en oncología viene reclamando desde hace varios años la necesidad de abordar las neoplasias de una forma mucho más personalizada y de realizar estudios moleculares más profundos que puedan guiarnos hacia el desarrollo de terapias más efectivas y apropiadas para cada paciente.

3.1. Papel de RRas2 en el desarrollo tumoral en modelos de ratón y en líneas tumorales humanas

Debido a la implicación de RRas2 en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, y más particularmente para explorar su posible función como impulsor de procesos de linfomagénesis nos planteamos estudiar el papel de RRas2 en la formación de tumores. Puesto que en nuestro laboratorio contábamos con el ratón *RRAS2*^{-/-}, estudiamos el efecto de la ausencia de RRas2 en dos modelos diferentes de cáncer en ratón (*Trp53*^{-/-} y *Eμ-myc*), así como en experimentos con líneas tumorales humanas. En primer lugar, los resultados obtenidos en el modelo de *Trp53*^{-/-} sugieren que RRas2 funciona como un oncogén en los primeros estadios de la transformación tumoral ya que los ratones deficientes en RRas2 tardaron más tiempo en desarrollar los síntomas de enfermedad en comparación con los ratones control. Esto podría estar indicando que RRas2 funciona en tumores de tipo linfóide de manera similar a como el grupo de Xosé Bustelo ha descrito que sucede en el caso del cáncer de mama, en donde RRas2 parece estar jugando un papel especialmente importante en los primeros etapas de la formación de la neoplasia (Larive et al., 2014). Además, el hecho de que en ausencia de RRas2 la mayoría de los tumores de estos ratones fueran de tipo no linfóide refuerza la idea de que RRas2 está jugando un papel importante en el sistema inmune y va en línea con nuestros resultados sobre la regulación de RRas2 en las señales derivadas del BCR y de CD40.

Los datos obtenidos en el modelo de *Eμ-myc* sugieren, por otro lado que en un modelo específico de linfomagénesis B, la ausencia de RRas2 acelera la mortalidad de los ratones. Asimismo, el análisis fenotípico de los tumores que hemos podido estudiar indica que la carencia de RRas2 provoca que aparezcan tumores más inmaduros que en los ratones *Eμ-myc* que sí tienen RRas2. El número de casos estudiados, sin embargo, es limitado y los datos estadísticos exigen que se estudie esta hipótesis más en profundidad. Los ratones *Eμ-myc* contienen una construcción transgénica insertada al azar en el genoma con un vector lentiviral (Adams et al., 1985). Esta estrategia, si bien ha permitido durante muchos años generar una gran cantidad de modelos de ratón transgénicos con los que desentrañar la función de numerosos genes, presenta varios inconvenientes. Por un lado, es difícil monitorizar en cada ratón el número de copias de la construcción que contiene en su genoma, lo que hace que distintos ratones puedan

estar expresando distintos niveles de *myc*. Por otro lado, dado que la inserción en el genoma es al azar, no se puede descartar que existan efectos secundarios derivados de la posible interrupción de genes o secuencias que puedan influir en el fenotipo final de los animales. Debido a estas desventajas, se hace necesario abordar la función oncogénica de RRas2 en modelos más sofisticados.

Por esta razón, actualmente hemos desarrollado en el laboratorio un modelo de ratón que, bajo la acción de la recombinasa Cre, pueden sobreexpresar la versión silvestre de RRas2 de manera específica de tejido al ser cruzados con ratones que tengan Cre bajo un promotor específico. De esta forma, cruzando nuestros ratones con ratones *Mb1-Cre* (que expresan Cre regulado por el promotor de Ig α) o *AID-Cre* (esto es, que expresan Cre bajo el promotor de la enzima AID), podremos analizar el efecto de tener altos niveles de RRas2 en linfocitos B y en linfocitos B de CG respectivamente. Esperamos que este modelo nos proporcione información importante acerca del potencial de RRas2 como promotor de la linfomagénesis B en general, o más concretamente en los procesos de transformación tumoral derivados del centro germinal. Por otro lado, contamos con otro modelo de ratón que expresa una versión de RRas2 constitutivamente activa debido a una mutación puntual (Q72L) que hace que no sea capaz de hidrolizar el GTP. De forma análoga al modelo anterior, podemos inducir a través del cruce con ratones Cre específicos de tejido la expresión del mutante de RRas2. El análisis de estos modelos en conjunto puede proporcionarnos información esencial en cuanto a cómo es de importante no sólo los niveles de expresión de RRas2 sino su actividad en su papel como conductor tumoral.

Finalmente, la posibilidad de modificar los niveles de proteína de RRas2 en líneas tumorales humanas nos ha permitido evaluar cómo afecta RRas2 a la capacidad proliferativa de las células en cultivo así como a la capacidad de invasión tumoral en modelos de xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos. Para ello, hemos utilizado la línea celular Raji, derivada de un linfoma de Burkitt humano, que expresa de manera endógena altos niveles de RRas2. De manera concordante con los datos obtenidos en el modelo *Trp53*^{-/-}, nuestros resultados muestran que en ausencia de RRas2 las células Raji presentan un defecto proliferativo en cultivo, y también son menos competentes para proliferar e invadir los tejidos en los xenotransplantes *in vivo*.

En este sentido, los datos presentados en este trabajo indican que RRas2 es un firme candidato a ser una diana terapéutica contra cánceres de células linfoides. Dada la naturaleza de esta molécula como GTPasa, queda por esclarecer si RRas2 desempeña una función oncogénica a través del aumento de la expresión de su versión silvestre o a través de mutaciones que modifiquen su actividad. Esperamos que el estudio de los nuevos modelos de ratón con los que contamos actualmente en el laboratorio esclarezca muchas cuestiones en torno a este problema.

3.2. RRas2: eje central entre el metabolismo y el cáncer

Nuestros datos indican que RRas2 es una proteína que regula la función metabólica de las células B, y por otro lado que tiene un papel importante en la formación de tumores linfoides. Estos dos hechos pueden estar íntimamente relacionados ya que una de las señas características de las células tumorales es precisamente la alteración metabólica. Se sabe que las células tumorales tienen una preferencia por la glucólisis como forma de obtención de ATP incluso en condiciones no limitantes de oxígeno, un fenómeno que se conoce como efecto Warburg y que fue descrito por Otto H. Warburg en la década de los años 20 (Warburg et al., 1927). La descripción de este proceso, también llamado glucólisis aerobia, se basó en la observación de que las células tumorales metabolizan la glucosa a lactato con una tasa mucho mayor que las células normales independientemente de la presencia de oxígeno, indicando que estas células tienen una función metabólica alterada. Una de las principales vías que regulan el metabolismo de la glucosa es la vía de PI3K, lo cual contribuye a relacionar de nuevo a RRas2 con la alteración del metabolismo metabólico.

La vía de PI3K regula el metabolismo a través de dos grandes rutas: por un lado, PI3K regula a mTOR, que está directamente implicado en la síntesis de proteínas; y por otro lado, PI3K regula la captación y utilización de la glucosa (Vander Heiden et al., 2009). PI3K activa a Akt, y ésta regula la expresión del transportador de glucosa, promueve la captación de glucosa, y estimula la actividad fosfofructoquinasa (DeBerardinis et al., 2008). La inhibición de la ruta de PI3K conlleva una disminución en el consumo de glucosa de las células tumorales, llegando incluso a poder correlacionarse la capacidad de disminuir ese consumo con la regresión tumoral (Engelman, 2009). De hecho, la deprivación de glucosa induce la muerte de las células tumorales, y en los casos donde se ha estudiado se ha observado que los pacientes de cáncer que presentan una reducción en el consumo de glucosa responden mejor a la terapia (Ben-Haim and Ell, 2009). No es de sorprender, por tanto, que la vía de PI3K haya sido el objetivo de diversos compuestos que están actualmente en ensayos clínicos como terapias anti-tumorales; y podría ser que la efectividad de estos compuestos resida precisamente en la detención o interrupción del metabolismo glucolítico.

En este trabajo hemos demostrado que RRas2 cumple una importante función metabólica en los linfocitos B, ya que en ausencia de esta GTPasa las células son incapaces de cumplir las demandas energéticas tras la activación. A su vez, sabemos que RRas2 juega un papel en la formación de los centros germinales y en el desarrollo tumoral, y que su actividad debe estar finamente regulada. Si en condiciones fisiológicas el control metabólico ejercido por RRas2 en las células B puede constituir un mecanismo de selección en el centro germinal, en condiciones patológicas RRas2 podría estar actuando como oncogén a través de su control metabólico mediado por activación de la ruta de PI3K. Nosotros proponemos un modelo en que el vínculo entre

ambas rutas tiene lugar a través del complejo mTORC1. Queda por averiguar si la regulación por RRas2 es a nivel transcripcional, controlando la expresión de genes de codifican proteínas mitocondriales, o si hay un nivel de regulación a nivel de traducción, como sugieren estudios recientes (Morita et al., 2013, Diaz-Munoz et al., 2015).

4. RRas2 en el desarrollo de los linfocitos B

Los resultados obtenidos en el modelo de cáncer *Eμ-myc* sugerían que RRas2 podría estar cumpliendo un papel no sólo como inductor de linfomas B sino también estar influyendo en el estadio de diferenciación de los linfocitos B que originan la neoplasia. Esto nos llevó a estudiar marcadores de diferenciación temprana de los linfocitos B en ratones silvestres y carentes de RRas2, así como a evaluar la capacidad de competición de los mismos en ensayos de reconstitución competitiva de médula ósea. Nuestros datos sugieren que la ausencia de RRas2 causa un bloqueo en el estadio de pro-B durante la maduración de los linfocitos B.

Los linfocitos B maduran a partir de las células madre hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario en el hígado fetal y en la etapa adulta en la médula ósea. Durante las últimas décadas numerosos estudios se han centrado en caracterizar los marcadores de superficie que distinguen las subpoblaciones de progenitores (revisado en Hardy and Hayakawa, 2001). Algunos de estos marcadores se indican en la Ilustración 10. Cabe resaltar que el desarrollo más temprano de los linfocitos B ocurre de manera independiente de la señalización del BCR, puesto que éste sólo se empieza a expresar en forma de pre-BCR a partir del estadio Pre-B. Consecuentemente, los ratones carentes de las enzimas Rag-1 y Rag-2, responsables del reordenamiento genómico de los genes de las inmunoglobulinas sufren una parada en la diferenciación de los linfocitos B precisamente en este estadio, que también se caracteriza por ser el último estadio en el que se expresa el marcador CD43 (Shinkai et al., 1992, Mombaerts et al., 1992).

Valiéndonos de los datos disponibles en la base de datos generada por el consorcio “Immunological Genome Project”, hemos podido analizar la expresión de RRas2 en las diferentes poblaciones B. Es de especial relevancia que si analizamos estos datos en los estadios tempranos de la diferenciación B, RRas2 mantiene unos niveles de expresión muy bajos con una única excepción: el estadio Pro-B (Ilustración 15). Este dato concuerda con nuestros resultados preliminares que apuntan a que RRas2 tiene una función en este estadio del desarrollo B.

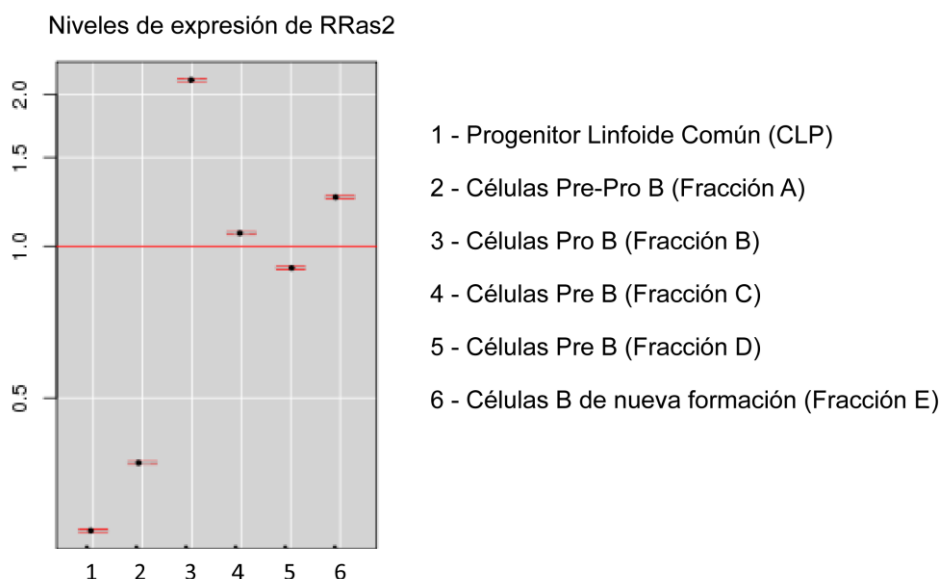


Ilustración 15. La expresión de RRas2 aumenta en el estadio Pro-B de la diferenciación B.

Diagrama que muestra los niveles de expresión de RRas2 expresado como la media del valor normalizado. En el gráfico se muestran las subpoblaciones B previas al estadio de células B inmaduras, tal y como se indica en la leyenda según la nomenclatura Filadelfia. Entre paréntesis se indica la fracción de acuerdo a lo descrito en Hardy et al., 1991. Modificado de la base de datos Immunological Genome Project (www.immgen.org).

Estos datos confirman que RRas2 puede tener una función nueva y que no se había visto hasta ahora relacionada con el desarrollo de los linfocitos. Esto es especialmente importante si pensamos que la alteración de RRas2 en tumores de tipo linfocito podría estar influyendo en el tipo de malignidad que se esté desarrollando, y esto a su vez tener consecuencias en el grado de agresividad de las mismas. No obstante, es importante tener en cuenta que a pesar del defecto observado en cuanto a la acumulación de linfocitos Pro-B en ausencia de RRas2, hay un porcentaje de células que consigue progresar y formar linfocitos B maduros capaces de migrar fuera de la médula ósea. Esto indica que el fenotipo en desarrollo de los linfocitos B *RRAS2*^{-/-} tiene ciertas fugas y obliga a estudiar esta cuestión en modelos de ratón más específicos, como por ejemplo el que sobreexpresa la versión silvestre o constitutivamente activa de RRas2 de manera específica de tejido (comentados en el punto 3.1 de la discusión). Por otro lado, es necesario abordar qué otros mecanismos están alterados ante la falta de RRas2 durante el desarrollo B, que puedan ser los responsables de este “escape” gracias al cual se compensa la carencia de esta GTPasa. Por último, el hecho de que las células deficientes en RRas2 se queden paradas en un estadio anterior a ensamblaje del BCR abre un campo de investigación nuevo donde explorar otras funciones que RRas2 pueda estar ejerciendo independientes de la señalización del BCR. En este sentido, en este trabajo hemos descrito que RRas2 puede asociarse directamente al co-receptor CD40, y esto abre la pregunta de si esta GTPasa podría estar también mediando la señalización de otros receptores importantes de los linfocitos B y T como por ejemplo CD19 o CD28 respectivamente. De hecho, el receptor CD19 modula la activación del

BCR a través de su asociación con éste y con otras moléculas de superficie permitiendo el reclutamiento de varias quinasas de la familia Ras, Src (Lyn, Fyn), Btk, adaptadores como Vav, Grb2, y PI3K (Wang et al., 2012). De esta forma, CD19 disminuye el umbral de activación del BCR, y amplifica la señalización pro-expansión y pro-supervivencia por el reclutamiento de PI3K y de sus quinasas efectoras (Wang et al., 2012). En cuanto al desarrollo de los linfocitos B, cabe resaltar que los ratones deficientes en el factor de transcripción Pax5, necesario para la expresión de CD19, presenta un bloqueo de los progenitores linfoides B precisamente en estadio Pro-B (Urbanek et al., 1994, Nutt et al., 1997), lo que se asemeja al fenotipo de nuestros ratones *RRAS2*^{-/-}. Sin embargo, los ratones deficientes en CD19 no parecen presentar ninguna alteración en sus progenitores linfoides aunque sí en los linfocitos B maduros de la periferia (Engel et al., 1995), lo que supone que debe haber un punto crítico en algún momento del desarrollo B responsable de la disminución de linfocitos B maduros pero que no se refleja en el número de progenitores. Este fenotipo sugiere la existencia de un cuello de botella que algunas células son capaces de eludir y que se asemeja con el problema encontrado en ausencia de *RRas2*. Por todos estos estudios previos, *RRas2* es un firme candidato a ser uno de los mediadores de CD19 y es una posibilidad que habrá que explorar en profundidad en el futuro.

Las conclusiones alcanzadas en esta tesis doctoral demuestran la importancia de *RRas2* como un nuevo modulador de la actividad de los linfocitos B, situándolo en un eje que conecta la respuesta linfocitaria a la llegada de sustancias patógenas al organismo con una ruta de señalización compleja vinculada a la producción energética mitocondrial de los linfocitos B. Este hallazgo pone de manifiesto el papel protagonista que tiene el metabolismo en el sistema inmune, apoyando trabajos recientes que han abierto un campo de investigación muy poco estudiado hasta ahora (Pearce et al., 2013). Este vínculo hace necesaria la revisión del funcionamiento del sistema inmune de forma que se contemple la gestión metabólica de los linfocitos no sólo como una fuente de energía necesaria para la supervivencia sino como un proceso que verdaderamente determina decisiones de destino y de diferenciación celular fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune. Además, los datos presentados en este trabajo reafirma la función de *RRas2* como una molécula potencialmente oncogénica que no sólo cumple un papel en el desarrollo de cánceres como el de mama (Larive et al., 2014) sino también en linfomas y leucemias B. Las rutas que se han caracterizado en este estudio constituyen un buen punto de partida para abordar esta cuestión y trabajar en posibles dianas terapéuticas dirigidas a modular la acción de *RRas2* en neoplasias linfoides.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. RRas2 juega un papel esencial en los linfocitos B y no redundante con otros miembros de la familia Ras en la formación de los centros germinales (CG).
2. Como consecuencia del defecto en la generación de los CG, los ratones carentes de RRas2 producen menos anticuerpos que han experimentado el cambio de clase y menos células B de memoria.
3. Los linfocitos B de CG deficientes en RRas2 presentan una acumulación de células con un fenotipo de zona oscura en cuanto a sus marcadores de superficie.
4. RRas2 es reclutado a los receptores BCR y CD40 y activa la ruta no canónica de NFκB en respuesta a la estimulación mediante un proceso dependiente de PI3K.
5. Los linfocitos B carentes de RRas2 tienen un defecto intrínseco en su capacidad proliferativa en respuesta a los estímulos del BCR y de CD40.
6. RRas2 controla el metabolismo energético mitocondrial de los linfocitos B. En consecuencia, los linfocitos B carentes de RRas2 no pueden satisfacer las demandas energéticas a las que se ven sometidos tras la estimulación antigénica.
7. RRas2 se encuentra sobreexpresado en tumores linfoides humanos y su silenciamiento en la línea Raji, procedente de un linfoma de Burkitt humano, causa un defecto en su capacidad proliferativa y de invasión tumoral.
8. RRas2 tiene una función proto-oncogénica en tumores de tipo linfóide y no en neoplasias de otros orígenes en el modelo de cáncer de ratón *Trp53*^{-/-}.
9. RRas2 desempeña un papel en el proceso madurativo de los linfocitos B en la médula ósea y su deficiencia provoca una acumulación de progenitores B en el estadio Pro-B.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, 318, 533-8.
- Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Luche, H., Fehling, H. J., Casellas, R., Kanagawa, O., Miyawaki, A. & Kurosaki, T. 2010. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 12192-7. doi: 10.1073/pnas.1005443107. Epub 2010 Jun 14.
- Aiba, Y., Oh-Hora, M., Kiyonaka, S., Kimura, Y., Hijikata, A., Mori, Y. & Kurosaki, T. 2004. Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16612-7.
- Alarcon, B. & Martinez-Martin, N. 2012. RRas2, RhoG and T-cell phagocytosis. *Small GTPases*, 3, 97-101.
- Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. & Cyster, J. G. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*, 5, 943-52.
- Allen, C. D., Okada, T., Tang, H. L. & Cyster, J. G. 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*, 315, 528-31.
- Arora, S., Matta, A., Shukla, N. K., Deo, S. V. & Ralhan, R. 2005. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog*, 42, 97-108.
- Banerjee, P., Ahmad, M. F., Grove, J. R., Kozlosky, C., Price, D. J. & Avruch, J. 1990. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8550-4.
- Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D., An, J., Nagasawa, T. & Cyster, J. G. 2013. Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity*, 39, 912-24.
- Barker, K. T. & Crompton, M. R. 1998. Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo. *Br J Cancer*, 78, 296-300.
- Basso, K. & Dalla-Favera, R. 2010. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.*, 105:193-210., 10.1016/S0065-2776(10)05007-8.
- Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A. A., Wang, K., Lim, W. K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M. J., Califano, A. & Dalla-Favera, R. 2010. Integrated biochemical and

- computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*, 115, 975-84.
- Baumjohann, D., Okada, T. & Ansel, K. M. 2011. Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development. *J Immunol*, 187, 2089-92.
- Ben-Haim, S. & Ell, P. 2009. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *J Nucl Med*, 50, 88-99.
- Berek, C., Berger, A. & Apel, M. 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, 67, 1121-9.
- Bergqvist, P., Stensson, A., Hazanov, L., Holmberg, A., Mattsson, J., Mehr, R., Bemark, M. & Lycke, N. Y. 2013. Re-utilization of germinal centers in multiple Peyer's patches results in highly synchronized, oligoclonal, and affinity-matured gut IgA responses. *Mucosal Immunol*, 6, 122-35.
- Bierie, B. & Moses, H. L. 2006. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 506-20.
- Bishop, G. A. 2004. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol*, 4, 775-86.
- Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L. & Kraus, Z. J. 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol*, 597, 131-51.
- Bos, J. L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- Bos, J. L. 1997. Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta*, 1333, M19-31.
- Burnet, F. M. 1976. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*, 26, 119-21.
- Capasso, M., Bhamrah, M. K., Henley, T., Boyd, R. S., Langlais, C., Cain, K., Dinsdale, D., Pulford, K., Khan, M., Musset, B., Cherny, V. V., Morgan, D., Gascoyne, R. D., Vigorito, E., Decoursey, T. E., Maclennan, I. C. & Dyer, M. J. 2010. HVCN1 modulates BCR signal strength via regulation of BCR-dependent generation of reactive oxygen species. *Nat Immunol*, 11, 265-72.
- Carboni, J. M., Yan, N., Cox, A. D., Bustelo, X., Graham, S. M., Lynch, M. J., Weinmann, R., Seizinger, B. R., Der, C. J., Barbacid, M. & Et Al. 1995. Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of Ras but not R-Ras2/TC21, transformation. *Oncogene*, 10, 1905-13.
- Caro-Maldonado, A., Wang, R., Nichols, A. G., Kuraoka, M., Milasta, S., Sun, L. D., Gavin, A. L., Abel, E. D., Kelsoe, G., Green, D. R. & Rathmell, J. C. 2014. Metabolic reprogramming is

- required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol*, 192, 3626-36.
- Castello, A., Gaya, M., Tucholski, J., Oellerich, T., Lu, K. H., Tafuri, A., Pawson, T., Wienands, J., Engelke, M. & Batista, F. D. 2013. Nck-mediated recruitment of BCAP to the BCR regulates the PI(3)K-Akt pathway in B cells. *Nat Immunol*, 14, 966-75.
- Ci, W., Polo, J. M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S. N., Ye, K., Farinha, P., Horsman, D. E., Gascoyne, R. D., Elemento, O. & Melnick, A. 2009. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*, 113, 5536-48.
- Clark, G. J., Kinch, M. S., Gilmer, T. M., Burridge, K. & Der, C. J. 1996. Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene*, 12, 169-76.
- Corcoran, L. M., Cory, S. & Adams, J. M. 1985. Transposition of the immunoglobulin heavy chain enhancer to the myc oncogene in a murine plasmacytoma. *Cell*, 40, 71-9.
- Cubelos, B., Sebastian-Serrano, A., Kim, S., Redondo, J. M., Walsh, C. & Nieto, M. 2008. Cux-1 and Cux-2 control the development of Reelin expressing cortical interneurons. *Dev Neurobiol*, 68, 917-25.
- Chan, A. M., Miki, T., Meyers, K. A. & Aaronson, S. A. 1994. A human oncogene of the RAS superfamily unmasked by expression cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7558-62.
- Chang, P. P., Barral, P., Fitch, J., Pratama, A., Ma, C. S., Kallies, A., Hogan, J. J., Cerundolo, V., Tangye, S. G., Bittman, R., Nutt, S. L., Brink, R., Godfrey, D. I., Batista, F. D. & Vinuesa, C. G. 2012. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol*, 13, 35-43.
- Chtanova, T., Tangye, S. G., Newton, R., Frank, N., Hodge, M. R., Rolph, M. S. & Mackay, C. R. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*, 173, 68-78.
- De Silva, N. S. & Klein, U. 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*, 15, 137-48.
- Deberardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- Delgado, P., Cubelos, B., Calleja, E., Martinez-Martin, N., Cipres, A., Merida, I., Bellas, C., Bustelo, X. R. & Alarcon, B. 2009. Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol*, 10, 880-8.

- Dengler, H. S., Baracho, G. V., Omori, S. A., Bruckner, S., Arden, K. C., Castrillon, D. H., Depinho, R. A. & Rickert, R. C. 2008. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol*, 9, 1388-98.
- Detre, C., Keszei, M., Garrido-Mesa, N., Kis-Toth, K., Castro, W., Agyemang, A. F., Veerapen, N., Besra, G. S., Carroll, M. C., Tsokos, G. C., Wang, N., Leadbetter, E. A. & Terhorst, C. 2012. SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. *Blood*, 120, 122-9.
- Diaz-Munoz, M. D., Bell, S. E., Fairfax, K., Monzon-Casanova, E., Cunningham, A. F., Gonzalez-Porta, M., Andrews, S. R., Bunik, V. I., Zarnack, K., Curk, T., Heggermont, W. A., Heymans, S., Gibson, G. E., Kontoyiannis, D. L., Ule, J. & Turner, M. 2015. The RNA-binding protein HuR is essential for the B cell antibody response. *Nat Immunol*, 16, 415-25.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. & Bradley, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-21.
- Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E. & Pagano, M. 2006. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 314, 467-71.
- Doughty, C. A., Bleiman, B. F., Wagner, D. J., Dufort, F. J., Mataraza, J. M., Roberts, M. F. & Chiles, T. C. 2006. Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood*, 107, 4458-65.
- Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., Mackeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O. & Manning, B. D. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39, 171-83.
- Ehrhardt, G. R., Leslie, K. B., Lee, F., Wieler, J. S. & Schrader, J. W. 1999. M-Ras, a widely expressed 29-kD homologue of p21 Ras: expression of a constitutively active mutant results in factor-independent growth of an interleukin-3-dependent cell line. *Blood*, 94, 2433-44.
- Eisen, H. N. & Siskind, G. W. 1964. Variations in Affinities of Antibodies during the Immune Response. *Biochemistry*, 3, 996-1008.
- Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. & Noelle, R. J. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229, 152-72.

- Engel, P., Zhou, L. J., Ord, D. C., Sato, S., Koller, B. & Tedder, T. F. 1995. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity*, 3, 39-50.
- Engelman, J. A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9, 550-62.
- Erdogan, M., Pozzi, A., Bhowmick, N., Moses, H. L. & Zent, R. 2007. Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 282, 27713-20.
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Coffey, P. J. & Demoulin, J. B. 2009. The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J Biol Chem*, 284, 10334-42.
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabanian, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., Cresta, S., Gargiulo, E., Forconi, F., Guarini, A., Arcaini, L., Paulli, M., Laurenti, L., Larocca, L. M., Marasca, R., Gattei, V., Oscier, D., Bertoni, F., Mullighan, C. G., Foa, R., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Dalla-Favera, R. & Gaidano, G. 2011. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*, 208, 1389-401.
- Farnsworth, C. L. & Feig, L. A. 1991. Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol*, 11, 4822-9.
- Gallagher, E., Enzler, T., Matsuzawa, A., Anzelon-Mills, A., Otero, D., Holzer, R., Janssen, E., Gao, M. & Karin, M. 2007. Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol*, 8, 57-63.
- Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F. & Brink, R. 2008. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity*, 28, 391-401.
- Gatto, D., Paus, D., Basten, A., Mackay, C. R. & Brink, R. 2009. Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses. *Immunity*, 31, 259-69.
- Gitlin, A. D., Mayer, C. T., Oliveira, T. Y., Shulman, Z., Jones, M. J., Koren, A. & Nussenzweig, M. C. 2015. HUMORAL IMMUNITY. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science*, 349, 643-6.
- Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. 2014. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature*, 509, 637-40.
- Goetz, C. A. & Baldwin, A. S. 2008. NF-kappaB pathways in the immune system: control of the germinal center reaction. *Immunol Res*, 41, 233-47.

- Goossens, T., Klein, U. & Koppers, R. 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2463-8.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- Graham, S. M., Cox, A. D., Drivas, G., Rush, M. G., D'eustachio, P. & Der, C. J. 1994. Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation. *Mol Cell Biol*, 14, 4108-15.
- Graham, S. M., Oldham, S. M., Martin, C. B., Drugan, J. K., Zohn, I. E., Campbell, S. & Der, C. J. 1999. TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene*, 18, 2107-16.
- Graham, S. M., Vojtek, A. B., Huff, S. Y., Cox, A. D., Clark, G. J., Cooper, J. A. & Der, C. J. 1996. TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways. *Mol Cell Biol*, 16, 6132-40.
- Green, J. A., Suzuki, K., Cho, B., Willison, L. D., Palmer, D., Allen, C. D., Schmidt, T. H., Xu, Y., Proia, R. L., Coughlin, S. R. & Cyster, J. G. 2011. The sphingosine 1-phosphate receptor S1P(2) maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nat Immunol*, 12, 672-80.
- Gronbaek, K., Straten, P. T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M. K., Hansen, N. E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K. & Guldberg, P. 1998. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood*, 92, 3018-24.
- Groux, H., O'garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389, 737-42.
- Gutierrez-Erlandsson, S., Herrero-Vidal, P., Fernandez-Alfara, M., Hernandez-Garcia, S., Gonzalo-Flores, S., Mudarra-Rubio, A., Fresno, M. & Cubelos, B. 2013. R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol Cancer*, 12, 127.
- Hacker, H. & Karin, M. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, 2006, re13.
- Han, S., Zheng, B., Dal Porto, J. & Kelsoe, G. 1995. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. IV. Affinity-dependent, antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers as a mechanism for maintaining self-tolerance. *J Exp Med*, 182, 1635-44.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. & Hayakawa, K. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 173, 1213-25.

- Hardy, R. R. & Hayakawa, K. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 19, 595-621.
- Harris, A. W., Pinkert, C. A., Crawford, M., Langdon, W. Y., Brinster, R. L. & Adams, J. M. 1988. The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med*, 167, 353-71.
- Hauer, J., Puschner, S., Ramakrishnan, P., Simon, U., Bongers, M., Federle, C. & Engelmann, H. 2005. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2874-9.
- Hauser, A. E., Junt, T., Mempel, T. R., Sneddon, M. W., Kleinstein, S. H., Henrickson, S. E., Von Andrian, U. H., Shlomchik, M. J. & Haberman, A. M. 2007. Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity*, 26, 655-67.
- Haynes, N. M., Allen, C. D., Lesley, R., Ansel, K. M., Killeen, N. & Cyster, J. G. 2007. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol*, 179, 5099-108.
- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K. & Kurosaki, T. 2009. PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J Exp Med*, 206, 681-9.
- Hozumi, N. & Tonegawa, S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 3628-32.
- Huang, Y., Saez, R., Chao, L., Santos, E., Aaronson, S. A. & Chan, A. M. 1995. A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene*, 11, 1255-60.
- Inabe, K., Ishiai, M., Scharenberg, A. M., Freshney, N., Downward, J. & Kurosaki, T. 2002. Vav3 modulates B cell receptor responses by regulating phosphoinositide 3-kinase activation. *J Exp Med*, 195, 189-200.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. & Weinberg, R. A. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, 4, 1-7.
- Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. 1991. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354, 389-92.
- Jacob, J., Przylepa, J., Miller, C. & Kelsoe, G. 1993. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. III. The kinetics of V region mutation and selection in germinal center B cells. *J Exp Med*, 178, 1293-307.

- Jacobs, S. R., Herman, C. E., Maciver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J. & Rathmell, J. C. 2008. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol*, 180, 4476-86.
- Jager, U., Bocskor, S., Le, T., Mitterbauer, G., Bolz, I., Chott, A., Kneba, M., Mannhalter, C. & Nadel, B. 2000. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*, 95, 3520-9.
- Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H. & Grunert, S. 2002. Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol*, 156, 299-313.
- Jang, K. J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S. L., Igarashi, K., Shimizu, A. & Sugai, M. 2015. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nat Commun*, 6, 6750.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R. & Jacks, T. 1997. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev*, 11, 2468-81.
- Johnston, R. J., Poholek, A. C., Ditoro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A. L., Craft, J. & Crotty, S. 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*, 325, 1006-10.
- Jou, S. T., Carpino, N., Takahashi, Y., Piekorz, R., Chao, J. R., Carpino, N., Wang, D. & Ihle, J. N. 2002. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110 δ in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol*, 22, 8580-91.
- Kepler, T. B. & Perelson, A. S. 1993. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today*, 14, 412-5.
- Kerfoot, S. M., Yaari, G., Patel, J. R., Johnson, K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein, S. H. & Haberman, A. M. 2011. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity*, 34, 947-60.
- Khalil, A. M., Cambier, J. C. & Shlomchik, M. J. 2012. B cell receptor signal transduction in the GC is short-circuited by high phosphatase activity. *Science*, 336, 1178-81.
- Kim, H. J., Verbruggen, B., Tang, X., Lu, L. & Cantor, H. 2010. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature*, 467, 328-32.
- King, I. L., Fortier, A., Tighe, M., Dibble, J., Watts, G. F., Veerapen, N., Haberman, A. M., Besra, G. S., Mohrs, M., Brenner, M. B. & Leadbetter, E. A. 2012. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol*, 13, 44-50.

- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T. & Okada, T. 2011. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity*, 34, 961-72.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K. & Dalla-Favera, R. 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol*, 7, 773-82.
- Klein, U. & Dalla-Favera, R. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 8, 22-33.
- Kloo, B., Nagel, D., Pfeifer, M., Grau, M., Duwel, M., Vincendeau, M., Dorken, B., Lenz, P., Lenz, G. & Krappmann, D. 2011. Critical role of PI3K signaling for NF-kappaB-dependent survival in a subset of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 272-7.
- Kozma, S. C., Ferrari, S., Bassand, P., Siegmann, M., Totty, N. & Thomas, G. 1990. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7365-9.
- Kuppers, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 3, 801-12.
- Kuppers, R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5, 251-62.
- Kurosaki, T. 2011. Regulation of BCR signaling. *Mol Immunol*, 48, 1287-91.
- Kurosaki, T., Shinohara, H. & Baba, Y. 2010. B cell signaling and fate decision. *Annu Rev Immunol*, 28, 21-55.
- Lam, K. P., Kuhn, R. & Rajewsky, K. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, 90, 1073-83.
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E. S., Neuber, D., Brown, J. R., Getz, G. & Wu, C. J. 2013. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152, 714-26.
- Laplanche, M. & Sabatini, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- Larive, R. M., Moriggi, G., Menacho-Marquez, M., Canamero, M., De Alava, E., Alarcon, B., Dosil, M. & Bustelo, X. R. 2014. Contribution of the R-Ras2 GTP-binding protein to primary breast tumorigenesis and late-stage metastatic disease. *Nat Commun*, 5, 3881.

- Lee, S. K., Rigby, R. J., Zotos, D., Tsai, L. M., Kawamoto, S., Marshall, J. L., Ramiscal, R. R., Chan, T. D., Gatto, D., Brink, R., Yu, D., Fagarasan, S., Tarlinton, D. M., Cunningham, A. F. & Vinuesa, C. G. 2011. B cell priming for extrafollicular antibody responses requires Bcl-6 expression by T cells. *J Exp Med*, 208, 1377-88.
- Lee, S. K., Silva, D. G., Martin, J. L., Pratama, A., Hu, X., Chang, P. P., Walters, G. & Vinuesa, C. G. 2012. Interferon-gamma excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. *Immunity*, 37, 880-92.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. & Meyer, T. 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15, 1235-41.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F. & Sargiacomo, M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*, 126, 111-26.
- Lycke, N. Y. & Bemark, M. 2012. The role of Peyer's patches in synchronizing gut IgA responses. *Front Immunol*, 3, 329.
- Marshall, C. J. 1996. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 197-204.
- Martinez-Martin, N., Fernandez-Arenas, E., Cemerski, S., Delgado, P., Turner, M., Heuser, J., Irvine, D. J., Huang, B., Bustelo, X. R., Shaw, A. & Alarcon, B. 2011. T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. *Immunity*, 35, 208-22.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V. E. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68, 869-77.
- Morita, M., Gravel, S. P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I. & Sonenberg, N. 2013. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab*, 18, 698-711.
- Movilla, N., Crespo, P. & Bustelo, X. R. 1999. Signal transduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene*, 18, 5860-9.
- Murphy, G. A., Graham, S. M., Morita, S., Reks, S. E., Rogers-Graham, K., Vojtek, A., Kelley, G. G. & Der, C. J. 2002. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J Biol Chem*, 277, 9966-75.
- Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K. & Kuppers, R. 2000. Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med*, 192, 1833-40.

- Nagasawa, T. 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 6, 107-16.
- Nieuwenhuis, P. & Opstelten, D. 1984. Functional anatomy of germinal centers. *Am J Anat*, 170, 421-35.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Hwang, D., Yang, X. O., Kang, H. S., Ma, L., Wang, Y. H., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q. & Dong, C. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*, 29, 138-49.
- Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H. & Dong, C. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science*, 325, 1001-5.
- Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A. & Busslinger, M. 1997. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev*, 11, 476-91.
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. & Ghosh, S. 2011. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*, 12, 695-708.
- Oft, M., Heider, K. H. & Beug, H. 1998. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol*, 8, 1243-52.
- Oh-Hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M. & Kurosaki, T. 2003. Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C-gamma2 to Ras in B cell receptor signaling. *J Exp Med*, 198, 1841-51.
- Okada, T., Maeda, A., Iwamatsu, A., Gotoh, K. & Kurosaki, T. 2000. BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation. *Immunity*, 13, 817-27.
- Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S. E., Salpekar, A., Waterfield, M. D., Smith, A. J. & Vanhaesebroeck, B. 2002. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science*, 297, 1031-4.
- Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. 2003. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol*, 3, 317-30.
- Omori, S. A. & Rickert, R. C. 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling and regulation of the antibody response. *Cell Cycle*, 6, 397-402.
- Oprea, M. & Perelson, A. S. 1997. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J Immunol*, 158, 5155-62.

- Otipoby, K. L., Waisman, A., Derudder, E., Srinivasan, L., Franklin, A. & Rajewsky, K. 2015. The B-cell antigen receptor integrates adaptive and innate immune signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 12145-50.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. & Donner, D. B. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401, 82-5.
- Pauls, S. D., Lafarge, S. T., Landego, I., Zhang, T. & Marshall, A. J. 2012. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: activation mechanisms, regulation and impact on cellular functions. *Front Immunol*, 3, 224.
- Pearce, E. L., Poffenberger, M. C., Chang, C. H. & Jones, R. G. 2013. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science*, 342, 1242454.
- Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster, J. G. 2009. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*, 460, 1122-6.
- Peter, M. E., Wileman, T. & Terhorst, C. 1993. Covalent binding of guanine nucleotides to the CD3-gamma chain of the T cell receptor/CD3 complex. *Eur J Immunol*, 23, 461-6.
- Phan, R. T. & Dalla-Favera, R. 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432, 635-9.
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Bea, S., Gonzalez-Diaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., Lopez-Guerra, M., Colomer, D., Tubio, J. M., Lopez, C., Navarro, A., Tornador, C., Aymerich, M., Rozman, M., Hernandez, J. M., Puente, D. A., Freije, J. M., Velasco, G., Gutierrez-Fernandez, A., Costa, D., Carrio, A., Guijarro, S., Enjuanes, A., Hernandez, L., Yague, J., Nicolas, P., Romeo-Casabona, C. M., Himmelbauer, H., Castillo, E., Dohm, J. C., De Sanjose, S., Piris, M. A., De Alava, E., San Miguel, J., Royo, R., Gelpi, J. L., Torrents, D., Orozco, M., Pisano, D. G., Valencia, A., Guigo, R., Bayes, M., Heath, S., Gut, M., Klatt, P., Marshall, J., Raine, K., Stebbings, L. A., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Campbell, P. J., Gut, I., Lopez-Guillermo, A., Estivill, X., Montserrat, E., Lopez-Otin, C. & Campo, E. 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475, 101-5.
- Pulvertaft, J. V. 1964. Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet*, 1, 238-40.
- Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T., Crute, J. J. & Kehry, M. R. 1998. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*, 37, 11836-45.
- Qiao, G., Lei, M., Li, Z., Sun, Y., Minto, A., Fu, Y. X., Ying, H., Quigg, R. J. & Zhang, J. 2007. Negative regulation of CD40-mediated B cell responses by E3 ubiquitin ligase Casitas-B-lineage lymphoma protein-B. *J Immunol*, 179, 4473-9.

- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordonez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A. J., Bea, S., Pinyol, M., Martinez-Trillos, A., Lopez-Guerra, M., Colomer, D., Navarro, A., Baumann, T., Aymerich, M., Rozman, M., Delgado, J., Gine, E., Hernandez, J. M., Gonzalez-Diaz, M., Puente, D. A., Velasco, G., Freije, J. M., Tubio, J. M., Royo, R., Gelpi, J. L., Orozco, M., Pisano, D. G., Zamora, J., Vazquez, M., Valencia, A., Himmelbauer, H., Bayes, M., Heath, S., Gut, M., Gut, I., Estivill, X., Lopez-Guillermo, A., Puente, X. S., Campo, E. & Lopez-Otin, C. 2012. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 44, 47-52.
- Raghavan, S. C., Swanson, P. C., Wu, X., Hsieh, C. L. & Lieber, M. R. 2004. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature*, 428, 88-93.
- Ramiscal, R. R. & Vinuesa, C. G. 2013. T-cell subsets in the germinal center. *Immunol Rev*, 252, 146-55.
- Ramsay, A. J., Quesada, V., Foronda, M., Conde, L., Martinez-Trillos, A., Villamor, N., Rodriguez, D., Kwarciak, A., Garabaya, C., Gallardo, M., Lopez-Guerra, M., Lopez-Guillermo, A., Puente, X. S., Blasco, M. A., Campo, E. & Lopez-Otin, C. 2013. POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 45, 526-30.
- Ranuncolo, S. M., Polo, J. M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Grealley, J., Green, R., Carroll, M. & Melnick, A. 2007. Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol*, 8, 705-14.
- Rasheed, A. U., Rahn, H. P., Sallusto, F., Lipp, M. & Muller, G. 2006. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol*, 36, 1892-903.
- Reuther, G. W. & Der, C. J. 2000. The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 157-65.
- Rickert, R. C., Rajewsky, K. & Roes, J. 1995. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature*, 376, 352-5.
- Rodda, L. B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T. & Cyster, J. G. 2015. Phenotypic and Morphological Properties of Germinal Center Dark Zone Cxcl12-Expressing Reticular Cells. *J Immunol*, 195, 4781-91.
- Rodriguez-Viciana, P., Sabatier, C. & McCormick, F. 2004. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol*, 24, 4943-54.
- Rodriguez, D., Bretones, G., Arango, J. R., Valdespino, V., Campo, E., Quesada, V. & Lopez-Otin, C. 2015. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *Int J Hematol*, 101, 219-28.

- Rong, R., He, Q., Liu, Y., Sheikh, M. S. & Huang, Y. 2002. TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene*, 21, 1062-70.
- Rosario, M., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. 2001. Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol Cell Biol*, 21, 3750-62.
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., Del Giudice, I., Fabbri, G., Brusca, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Fama, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., Deaglio, S., Pasqualucci, L., Guarini, A., Dalla-Favera, R., Foa, R. & Gaidano, G. 2012. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 119, 2854-62.
- Rowland, S. L., Tremblay, M. M., Ellison, J. M., Stunz, L. L., Bishop, G. A. & Hostager, B. S. 2007. A novel mechanism for TNFR-associated factor 6-dependent CD40 signaling. *J Immunol*, 179, 4645-53.
- Rui, L., Schmitz, R., Ceribelli, M. & Staudt, L. M. 2011. Malignant pirates of the immune system. *Nat Immunol*, 12, 933-40.
- Schwickert, T. A., Alabyev, B., Manser, T. & Nussenzweig, M. C. 2009. Germinal center reutilization by newly activated B cells. *J Exp Med*, 206, 2907-14.
- Schwickert, T. A., Lindquist, R. L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M. H., Dustin, M. L. & Nussenzweig, M. C. 2007. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature*, 446, 83-7.
- Schwickert, T. A., Victora, G. D., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Mugnier, M. R., Gitlin, A. D., Dustin, M. L. & Nussenzweig, M. C. 2011. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J Exp Med*, 208, 1243-52.
- Shaffer, A. L., 3rd, Young, R. M. & Staudt, L. M. 2012. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol*, 30, 565-610.
- Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P. & Staudt, L. M. 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13, 199-212.
- Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J. W., Blenis, J., Pende, M. & Sonenberg, N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J*, 25, 2781-91.
- Sharma, R., Sud, N., Chattopadhyay, T. K. & Ralhan, R. 2005. TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology*, 69, 10-8.

- Shen, H. M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X. & Storb, U. 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*, 280, 1750-2.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. & Et Al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68, 855-67.
- Shinohara, H., Maeda, S., Watarai, H. & Kurosaki, T. 2007. IkappaB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells. *J Exp Med*, 204, 3285-93.
- Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., Depinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L. & Rajewsky, K. 2009. PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*, 139, 573-86.
- Suzuki, T., Nagao, A. & Suzuki, T. 2011. Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet*, 45, 299-329.
- Swat, W. & Fujikawa, K. 2005. The Vav family: at the crossroads of signaling pathways. *Immunol Res*, 32, 259-65.
- Takahashi, Y., Inamine, A., Hashimoto, S., Haraguchi, S., Yoshioka, E., Kojima, N., Abe, R. & Takemori, T. 2005. Novel role of the Ras cascade in memory B cell response. *Immunity*, 23, 127-38.
- Thome, M. 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol*, 4, 348-59.
- Tsujimoto, Y., Louie, E., Bashir, M. M. & Croce, C. M. 1988. The reciprocal partners of both the t(14; 18) and the t(11; 14) translocations involved in B-cell neoplasms are rearranged by the same mechanism. *Oncogene*, 2, 347-51.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. & Busslinger, M. 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*, 79, 901-12.
- Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P. H., Keats, J. J., Wang, H., Vignali, D. A., Bergsagel, P. L. & Karin, M. 2008. Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*, 9, 1364-70.
- Vallera, D. A., Chen, H., Sicheneder, A. R., Panoskaltsis-Mortari, A. & Taras, E. P. 2009. Genetic alteration of a bispecific ligand-directed toxin targeting human CD19 and CD22 receptors resulting in improved efficacy against systemic B cell malignancy. *Leuk Res*, 33, 1233-42.

- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324, 1029-33.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M. J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P. H., Zvelebil, M. J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J. & Waterfield, M. D. 1997. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4330-5.
- Victora, G. D. 2014. SnapShot: the germinal center reaction. *Cell*, 159, 700-700 e1.
- Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. 2012. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 30, 429-57.
- Victora, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L. & Nussenzweig, M. C. 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 143, 592-605.
- Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B. J., Reynolds, H., Mcadam, S., Emson, P. C., McKenzie, A. & Turner, M. 2004. Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG. *Mol Cell Biol*, 24, 719-29.
- Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R. & King, C. 2008. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity*, 29, 127-37.
- Wang, K., Wei, G. & Liu, D. 2012. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1, 36.
- Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. 1927. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8, 519-30.
- Weber, M., Treanor, B., Depoil, D., Shinohara, H., Harwood, N. E., Hikida, M., Kurosaki, T. & Batista, F. D. 2008. Phospholipase C-gamma2 and Vav cooperate within signaling microclusters to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. *J Exp Med*, 205, 853-68.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118, 843-6.
- Werner, M., Hobeika, E. & Jumaa, H. 2010. Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol Rev*, 237, 55-71.
- Willis, T. G., Zalcberg, I. R., Coignet, L. J., Wlodarska, I., Stul, M., Jadayel, D. M., Bastard, C., Treleaven, J. G., Catovsky, D., Silva, M. L. & Dyer, M. J. 1998. Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood*, 91, 1873-81.

- Wu, Y., El Shikh, M. E., El Sayed, R. M., Best, A. M., Szakal, A. K. & Tew, J. G. 2009. IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int Immunol*, 21, 745-56.
- Yamazaki, T., Takeda, K., Gotoh, K., Takeshima, H., Akira, S. & Kurosaki, T. 2002. Essential immunoregulatory role for BCAP in B cell development and function. *J Exp Med*, 195, 535-45.
- Yasuda, T., Maeda, A., Kurosaki, M., Tezuka, T., Hironaka, K., Yamamoto, T. & Kurosaki, T. 2000. Cbl suppresses B cell receptor-mediated phospholipase C (PLC)-gamma2 activation by regulating B cell linker protein-PLC-gamma2 binding. *J Exp Med*, 191, 641-50.
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L. M., Lee, S. K., He, Y., Sutcliffe, E. L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., Ellyard, J. I., Parish, I. A., Ma, C. S., Li, Q. J., Parish, C. R., Mackay, C. R. & Vinuesa, C. G. 2009. The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity*, 31, 457-68.
- Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Cheung, H. H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W. C., Mak, T. W., Korneluk, R. G. & Cheng, G. 2008. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol*, 9, 1371-8.
- Zhang, Q., Siebert, R., Yan, M., Hinzmann, B., Cui, X., Xue, L., Rakestraw, K. M., Naeve, C. W., Beckmann, G., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Nowotny, H., Vesely, M., Callet-Bauchu, E., Salles, G., Dixit, V. M., Rosenthal, A., Schlegelberger, B. & Morris, S. W. 1999. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nat Genet*, 22, 63-8.
- Zhang, S., Pruitt, M., Tran, D., Du Bois, W., Zhang, K., Patel, R., Hoover, S., Simpson, R. M., Simmons, J., Gary, J., Snapper, C. M., Casellas, R. & Mock, B. A. 2013. B cell-specific deficiencies in mTOR limit humoral immune responses. *J Immunol*, 191, 1692-703.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. & Cahalan, M. D. 2005. STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, 437, 902-5.
- Zhao, L. & Vogt, P. K. 2008. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, 27, 5486-96.